



Joana Costa Assunção

Licenciada em Biologia

Surdez em Portugal: Estudos genéticos e funcionais do gene da conexina

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Maria Helena Caria, Professora
Coordenadora da ESS/IPS e Investigadora do BioFIG/FCUL.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Sampaio

Arguente: Doutora Luciana da Costa

Vogal: Prof. Doutora Maria Helena Caria



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro de 2014



Joana Costa Assunção

Licenciada em Biologia

Surdez em Portugal: Estudos genéticos e funcionais do gene da conexina

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Doutora Maria Helena Caria, Professora
Coordenadora da ESS/IPS e Investigadora do BioFIG/FCUL.

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Sampaio

Arguente: Doutora Luciana da Costa

Vogal: Prof. Doutora Maria Helena Caria



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro de 2014

Copyright Joana Costa Assunção, FCT/UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, à Professora Maria Helena Caria, orientadora desta dissertação pela sua orientação científica, pelo tempo que me dedicou, pela confiança depositada em mim, pelas sugestões e conhecimento, encorajamento, positivismo e claro, pela sua amizade.

À Professora Graça Fialho, por me ter recebido de uma forma bastante calorosa no seu grupo e por todo o apoio prestado. Agradeço-lhe também a oportunidade de realizar o meu projeto de mestrado neste grupo da genética da surdez.

À Joana Chora, por todo o companheirismo. Pelas manhãs, pelas tardes e por todas as horas de almoço que passámos. Pelas grandes sugestões de trabalho. Por todo o apoio prestado no laboratório e pelas risadas que nos mantinham sempre motivadas para o dia seguinte. Queria agradecer igualmente, ao Tiago Matos por ter sido um bom e grande amigo, por se ter mostrado sempre disponível e pela ótima pessoa que é. Sem ele nunca teria conseguido o meu primeiro contacto com o grupo. Agradeço toda a ajuda e cada conversa. A ele e à Joana um obrigada especial. Espero que estejamos sempre em contacto, e sempre a tempo de nos deliciarmos com a nossa sobremesa preferida!

À Teresa, à Rute e à Marta, por todo o apoio prestado. Sem elas, nada seria possível. Agradeço-vos tantas vezes quanto a quantidade de nanogramas que utilizei do vosso armário juntamente com a quantidade de milissegundos que me dirigi perto de vocês para falar.

À Professora Filomena Caeiro e à Professora Rita Zilhão pelos esclarecidos prestados, pela partilha de informação, conhecimento e pela disponibilidade que sempre tiveram. Ao Professor Carlos Farinha e às suas alunas, por nos ajudarem inicialmente no projeto e por nos dispensarem materiais necessários para a conclusão de todo o trabalho. Obrigada por todas as horas de apoio.

À Professora Solveig e aos investigadores do grupo da biologia do desenvolvimento, especialmente ao Gonçalo Pinheiro. Prometo voltar a passar dias de grande calor na sala escura da microscopia. Obrigada por toda a ajuda e paciência.

Ao meu querido amigo Nuno Santos, que não me perdoaria se o seu nome não estivesse presente. Obrigada do fundo do coração pela ajuda infundável, pelo seu conhecimento e pelo seu espírito crítico.

Aos meus Pais, Paula e Carlos e à minha irmã Carolina por toda a força que me deram nos momentos mais complicados. Obrigada por fazerem de mim a mulher que sou hoje, por me terem apoiado incondicionalmente, pela paciência nos dias de maior desespero, pela companhia e interesse nos dias de maior sucesso e por toda a curiosidade mostrada por todo o meu trabalho ao longo da tese. São as pessoas mais importantes para mim e agradeço-vos a oportunidade de poder estudar, de me poder formar na área que escolhi para mim, e de poder ser vossa filha e irmã, pois para mim é o maior orgulho.

Aos meus amigos que estavam comigo nos momentos em que as bactérias não cresciam e eu desesperava. A eles e a elas, que me distraíam nas pausas e nas folgas da tese. Um grande obrigada pelos cafés, pela praia, pelas bifanas à beira da piscina, pelos croissants de chocolate gigantes, pelas danças, pela amizade e, mais importante ainda, pelo interesse no meu trabalho, ainda que para alguns este tema fosse algo sobrenatural.

Resumo

A surdez é a deficiência sensorial mais comum na população humana, afetando o desenvolvimento social do indivíduo afetado por esta patologia. Estima-se que 50% dos casos de deficiência auditiva podem ser evitáveis. Cerca de 1/1000 recém-nascidos apresentam surdez e 1/3 da população acima dos 65 anos é também afetada.

No presente estudo, foram analisadas 19 famílias diferentes. Analisou-se ainda 399 amostras aleatórias de recém-nascidos provenientes das várias regiões de Portugal. Mutações no gene *GJB2*, que codifica para a Cx26, são a principal causa de surdez hereditária não síndrômica, como tal, foi analisado nos dois tipos de população em estudo, tal como o gene *GJB6*, que codifica para a Cx30. Nas famílias analisadas foram encontradas as mutações c.35delG, p.Met34Thr e p.R127H, no gene *GJB2*, as quais se contam entre as mutações mais comuns na população portuguesa. Na população aleatória foram encontradas as mutações c.35delG, p.Met34Thr e K224Q, assim como o polimorfismo F83L.

Foram caracterizadas funcionalmente três mutações da Cx26 – a p.Leu213X, p.Gly160Ser e p.Gly160Cys. Verificou-se que as proteínas contendo a mutação p.Leu213X foram observadas principalmente no citoplasma, o que sugere que elas são aí retidas. O défice no seu tráfego para a membrana poderá estar relacionado com o facto de esta mutação originar um codão STOP no domínio C-terminal da proteína.

As proteínas que continham a mutação p.Gly160Ser e a p.Gly160Cys são transportadas até à membrana plasmática, tal como a Cx26 selvagem. No entanto, a permeabilidade dos canais intercelulares compostos por Cx26 apresentando estas mutações não foi investigada.

Este estudo contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre a surdez hereditária e o espectro de mutações no locus DFNB1. Permitiu também a primeira caracterização funcional de três mutações da Cx26. Os estudos funcionais têm em vista a possível aplicação de terapias destinadas à recuperação da função nativa da Cx26.

Palavras-chave: Surdez, Estudos funcionais, p.Leu213X, p.Gly160Ser, p.Gly160Cys.

Abstract

Deafness is the most common sensory deficit in humans affecting the social development of each individual affected by this pathology. It is estimated that 50% of hearing impairment can be avoided. About 1/1000 newborns show deafness and 1/3 of the population over 65 is also affected.

In this study 19 different families were analysed. 399 random samples from newborns coming from the different regions of Portugal. Mutations in *GJB2* gene, which encodes Cx26, are the main cause for hereditary non syndromic deafness, being thus analysed in the two types of samples in the study, such as *GJB6* gene, which encodes Cx30. In the analysed families the mutations c.35delG, p.Met34Thr e p.R127H in the *GJB2* gene were found. These are among the most common mutations in the Portuguese population. In the random samples the c.35delG, p.Met34Thr and K224Q mutations were found, as well as the F83L polymorphism.

Three mutations of the Cx26 – a p.Leu213X, p.Gly160Ser and p.Gly160Cys have been functionally characterised. The p.Leu213X mutation has been observed mainly in the cytoplasm, which suggests that they are hold there. The deficit in their course towards the membrane might be connected to the fact that this mutation originates a STOP codon in the C-terminus domain of the protein.

The proteins carrying the p.Gly160Ser and the p.Gly160Cys mutation are transported up to the plasmatic membrane, just like the wild Cx26. However, the permeability of the intercellular channels composed by Cx26 presenting these mutations was not researched.

This study contributes to deepen the knowledge on hereditary deafness and the range of mutations in the *DFNB1* locus. It has also allowed the first functional characterization of the three mutations of Cx26. The functional studies have a future implementation of therapies focused on the recovery of the native function of Cx26.

Keywords: Deafness, Functional studies, Leu213X, p.Gly160Ser, p.Gly160Cys.

Índice geral

Conteúdo

ÍNDICE GERAL	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
ÍNDICE DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES	XIX
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. ESTRUTURA E FISIOLOGIA DO OUVIDO	1
2. EPIDEMIOLOGIA DA SURDEZ	2
2.1. Idade.....	3
2.2. Grau	3
2.3. Origem.....	4
2.4. Tipo de surdez	4
3. ESTUDOS GENÉTICOS	5
4. CONEXINAS E JUNÇÕES COMUNICANTES – ESTRUTURA E FUNÇÃO.....	5
4.1. Conexina 26.....	7
4.2. Conexina 30.....	8
5. ESTUDOS FUNCIONAIS	11
5.1. Classe I – Ausência de proteína.....	12
5.2. Classe II – Ausência de tráfego celular	13
5.3. Classe III – Ausência de função.....	13
5.4. Classe IV – Menor função.....	13
5.5. Classe V – Menor expressão de Proteína.....	14
5.6. Classe VI – Menor estabilidade	14
5.7. As mutações <i>p.Leu213X</i> , <i>p.Gly160Cys</i> e <i>p.Gly160Ser</i>	14
6. OBJETIVOS	15
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	17
2. EXTRAÇÃO DE DNA GENÓMICO A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE	18
3. AMPLIFICAÇÃO POR POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) DO GENE <i>GJB2</i>	19
4. AMPLIFICAÇÃO POR PCR MULTIPLEX DO GENE <i>GJB6</i>	20
5. ELETROFORESE DE PRODUTOS DE PCR.....	21
6. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	21

7. SEQUENCIAÇÃO	22
8. CULTURA CELULAR	22
8.1 Congelamento das células.....	23
8.2. Descongelamento das células.....	23
9. CLONAGEM DE CX26	23
9.1. Mutagênese dirigida (Site-directed mutagenesis).....	24
9.2. Bactérias competentes (DH5α)	25
9.3 Transformação	26
9.3.1 Transformação do DNA selvagem.....	26
9.3.2 Transformação do DNA mutado	26
9.4 Mini e Medi-Preparação do plasmídeo.....	27
9.5 Transfecção celular.....	28
10. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA CX26:	29
10.1 Western Blot	29
10.1.1 Géis de proteínas (SDS-PAGE).....	29
10.1.2 Transferência de proteínas.....	29
10.1.3 Revelação e quantificação da intensidade das bandas	31
10.2. Imunofluorescência	31
III. RESULTADOS	33
1. FAMÍLIAS COM SURDEZ – ANÁLISE DO GENE <i>GJB2</i> E <i>GJB6</i>	33
1.1. Análise do gene <i>GJB2</i>	33
1.2. Análise do gene <i>GJB6</i>	35
2. POPULAÇÃO ALEATÓRIA – ANÁLISE DO GENE <i>GJB2</i> E <i>GJB6</i>	36
2.1. Análise do gene <i>GJB2</i>	36
2.2. Análise do gene <i>GJB6</i>	39
3. ESTUDOS FUNCIONAIS <i>IN VITRO</i>	40
IV. DISCUSSÃO.....	47
1. ANÁLISE DAS FAMÍLIAS	47
1.1 Família PK	48
1.2 Família PL.....	49
1.3 Família PM.....	50
1.4 Família Q	50
2. ANÁLISE DA POPULAÇÃO ALEATÓRIA	52
2.1. K224Q	53
2.2 F83L.....	53

2.3 c.35delG e p.Met34Thr.....	53
3. ESTUDOS FUNCIONAIS	53
3.1 Quantificação da proteína.....	54
3.2 Localização da Conexina 26.....	55
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	56
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS	65

Índice de Figuras

Fig. 1. Estrutura esquemática do Ouvido	1
Fig. 2. Representação do audiograma.....	3
Fig. 3. Representação da cadeia de aminoácidos da conexina 26 com mutações.	6
Fig. 4. Região do cromossoma 13q11-12 com a localização das deleções relativamente aos genes <i>GJB2</i> , <i>GJB6</i> e <i>CRYL1</i>	8
Fig. 5. Estrutura tridimensional dos conexões formados por conexina 26.....	9
Fig. 6. Representação esquemática das conexinas, conexões e junções comunicantes.....	10
Fig. 7. Esquema de processamento de proteínas no retículo endoplasmática.	12
Fig. 8. Esquema das classes de mutações das conexinas.....	14
Fig. 9. Diagrama do vetor pCMV6-XL5	24
Fig. 10. Esquema da transferência da proteína do gel para a membrana de PVDF.....	30
Fig. 11. Eletroforetograma da sequência mutada com c.35delG em heterozigotia.	33
Fig. 12. Eletroforetogramas da sequência mutada com c.35delG em homozigotia.	34
Fig. 13. Eletroforetograma da sequência mutada com Met34Thr.	34
Fig. 14. Eletroforetograma da sequência mutada com R127H.....	35
Fig. 15. Eletroforese em gel de agarose para análise das amostras PJ1, PK1, PL1, PM1, PN2, PO1, PP1, estudadas para <i>GJB6</i>	36
Fig. 16. Eletroforetograma da sequência mutada com mutação K224Q.	37
Fig. 17. Eletroforetogramas da sequência mutada com polimorfismo F83L.	37
Fig. 18. Eletroforetograma da sequência com a mutação c.35delG.	38
Fig. 19. Eletroforetograma da sequência mutada com mutação K224Q.	38
Fig. 20. Eletroforetograma da sequência mutada com mutação Met34Thr.....	39
Fig. 21. Eletroforese em gel de agarose para análise da população aleatória das regiões dos Açores (AAC) e de Lisboa (ALX), estudadas para <i>GJB6</i>	39
Fig. 22. Bactérias GCL5 α transformadas com o vetor pCMV6-XL5 (Sequência selvagem da Cx26). 40	
Fig. 23. Bactérias NZYStar® transformadas com as três mutações.	40
Fig. 24. Controlos da transformação de bactérias NZYStar®.....	41
Fig. 25. Controlo da mutagénesse dirigida e controlo da transformação.....	42
Fig. 26. Eletroforetograma da sequência mutada com p.Leu213X.	42
Fig. 27. Eletroforetograma da sequência mutada com p.Gly160Cys.	43
Fig. 28. Eletroforetograma da sequência mutada com p.Gly160Ser.	43
Fig. 29. Análise de Western Blot da expressão das proteínas	44
Fig. 30. Análise de Western Blot da expressão das proteínas.	44

Fig. 31. Localização celular da Cx26 selvagem e mutantes para as mutações p.Gly160Ser, p.Gly160Cys e p.Leu213X em células HeLa.	45
Fig. 32. Heredograma da família Q.	51
Fig. 33. Heredograma da família PJ.	52

Índice de Tabelas

Tabela 1. População aleatória de Portugal.	18
Tabela 2. <i>Primers</i> do PCR utilizados para amplificação do exão 2 do <i>GJB2</i>	19
Tabela 3. Programa de PCR do gene <i>GJB2</i>	20
Tabela 4. Pares de <i>primers</i> com a respetiva sequência, temperatura de <i>melting</i> e tamanho dos fragmentos amplificados do gene <i>GJB6</i>	20
Tabela 5. Programa de PCR multiplex do gene <i>GJB6</i>	21
Tabela 6. Programa de PCR da mutagénese dirigida	25
Tabela 7. Resumo dos indivíduos das várias famílias sequenciadas com os respetivos genótipos e fenótipos.	48
Tabela 8. Frequência alélica das mutações encontradas na região codificante do gene <i>GJB2</i> nos Açores.....	52

Lista de abreviaturas, siglas e unidades

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
%	Porcentagem
A	Adenina
AMP	Ampicilina
Arg	Aminoácido Arginina
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)
C	Citosina
c.DNA	DNA complementar
Ca²⁺	Ião Cálcio
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Dióxido de carbono
CRYL1	Crystallin lambda 1 gene (Gene que expressa a proteína Cristalino lambda 1)
Cx26	Conexina 26
Cx30	Conexina 30
Cys	Aminoácido Cisteína
Da	Dalton
dB	Decibel
Del	Deleção
DFNB1	Locus para surdez não-sindrômica autossômica recessiva, compreendendo os genes <i>GJB2</i> e <i>GJB6</i> .
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Sulfóxido de dimetilo)
DNA	Desoxirribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	Desorribonucleotide (Desoxirribonucleótido)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)
FBS	Fetal Bovine Serum (Soro fetal bovino)
G	Guanina (Nucleótido)
G	Gauge (Calibre da agulha)

g	Força gravítica (Aceleração da centrífuga)
GJB2	Gap junction Beta-2 (Gene que codifica a proteína junção comunicante Beta-2, também chamada de conexina 26)
GJB6	Gap junction Beta-6 (Gene que codifica a proteína junção comunicante Beta-6, também chamada de conexina 30)
Gly	Aminoácido Glicina
Kb	Kilobase
HEK	Human Embryonic Kidney Cells (Células embrionárias de rim humano)
His	Aminoácido Histidina
Hz	Hertz
H₂O_d	Água destilada
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida
K⁺	Ião potássio
LA	Meio Luria Agar
LB	Meio Luria Broth
Leu	Aminoácido Leucina
M	Molar
mA	Miliampere
MCS	Multiple Cloning Site (Local múltiplo de clonagem)
Met	Aminoácido Metionina
Min	Minuto
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm²	Milímetro quadrado
Na⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center of Biotechnology Information (Centro nacional de informação em biotecnologia)
OD	Optical density (Densidade ótica)
p.	(mutação) a nível da proteína
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese de gel de poliacrilamida)

pb	Pares de base
PBS	Phosphate-buffered saline (Tampão fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PVDF	Polyvinylidene fluoride (Difluoreto de polivinilideno)
q	Braço longo do cromossoma
Rpm	Rotações por minuto
SDS	(Sodium dodecyl sulfate) Dodecil sulfato de sódio
Seg	Segundo
Ser	Aminoácido Serina
T	Timina
TBE	Tris/Borato/EDTA
Thr	Aminoácido Treonina
Tm	Temperatura de melting
TSS	Transformation & Storage Solution (Solução de armazenamento e transformação)
HCL	Ácido clorídrico
U	Unidade
UV	Ultra violeta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosida

I. INTRODUÇÃO

1. Estrutura e fisiologia do ouvido

O aparelho auditivo pode ser dividido em três partes: ouvido externo, médio e interno (Fig.1). Do ouvido externo faz parte o pavilhão auricular e o canal auditivo que termina no tímpano. Do ouvido médio fazem parte três ossículos, mais conhecidos como martelo, estribo e bigorna. Por último, no ouvido interno, existe uma estrutura membranosa em forma de labirinto (cóclea) preenchida por um fluido denominado por endolinfa e imersa noutro fluido denominado por perilinfa. Para além da cóclea existe ainda uma outra estrutura responsável pelo equilíbrio e orientação espacial a que chamamos de vestíbulo (Petit *et al.*, 2001; Willems, 2000).

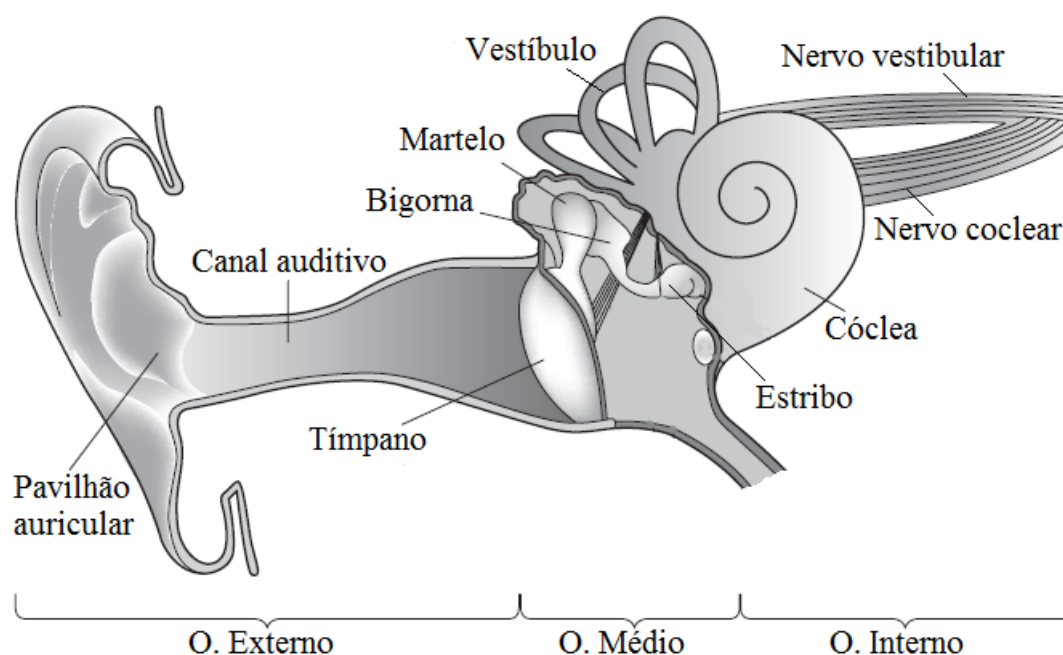


Fig. 1. Estrutura esquemática do Ouvido. Aparelho auditivo dividido em ouvido externo que vai desde o exterior até ao tímpano; ouvido médio do qual fazem parte os ossículos e ouvido interno do qual faz parte a cóclea, última estrutura do ouvido interveniente no processo de audição. Adaptada de Paul e Whitelaw, 2011.

As ondas sonoras são captadas do meio ambiente através do pavilhão auricular e conduzidas ao longo do canal auditivo externo até à membrana timpânica. O tímpano vibra em resposta às alterações de pressão do som, convertendo as ondas sonoras vindas do canal auditivo em ondas mecânicas (Paul e Whitelaw, 2011). Por sua vez, essas ondas mecânicas chegam até ao ouvido médio, fazendo com que os

ossículos se movam. Este movimento dos ossículos vai propagar e amplificar as ondas mecânicas até à cóclea, através da vibração dos fluidos nela existentes (Willems, 2000).

A cóclea tem como função processar os sinais auditivos, ou seja, converter as ondas mecânicas provenientes do ouvido médio em sinais elétricos (impulsos nervosos). Esta conversão é feita com o auxílio das células ciliadas existentes no elemento sensível do ouvido interno, denominado por Órgão de Corti (Willems, 2000).

As células ciliadas apresentam na sua superfície apical várias dezenas de estereocílios que se defletem (Bodmer, 2008). Esta deflexão é devida à estimulação das ondas mecânicas que percorrem a endolinfa no Órgão de Corti. O movimento dos estereocílios cria uma tensão que provoca a contração e distensão dos motores moleculares ao longo da membrana plasmática e do citoesqueleto (Petit *et al.*, 2001).

A perilinfa é um fluido que apresenta uma concentração de iões semelhante à concentração de todos os outros fluidos extracelulares, contrariamente à endolinfa que apresenta um conteúdo iónico semelhante ao conteúdo dos fluidos intracelulares, com elevada concentração de K^+ e baixa concentração de Na^+ (Teubner *et al.*, 2003).

Com o movimento dos estereocílios ocorre a abertura de canais e consequentemente o influxo de iões K^+ da endolinfa para o interior das células (Teubner *et al.*, 2003). Deste modo, ocorre a despolarização da membrana das células ciliadas e o influxo de iões Ca^{2+} , responsáveis pela fusão das vesículas sinápticas com libertação de neurotransmissores. Através de sucessivos potenciais de ação, a informação viaja assim, através sinapses aferentes, ao longo do nervo coclear até chegar ao córtex auditivo. O potencial de membrana é proporcional ao estímulo acústico permitindo ao cérebro interpretar as características do som tais como a frequência, intensidade e duração, descodificando a mensagem (Willems, 2000; Paul e Whitelaw, 2011).

O processo de reciclagem de iões é fulcral para que haja a repolarização da membrana e consequentemente, para que os níveis de iões sejam repostos de forma a que haja um normal processo auditivo e descodificação da próxima mensagem (Petit *et al.*, 2001).

2. Epidemiologia da Surdez

A surdez ou falta de audição é a redução total ou parcial da capacidade de um indivíduo detetar sons. Trata-se da deficiência sensorial mais comum na população humana, afetando mais de 360 milhões de indivíduos no mundo, dos quais fazem parte cerca de 32 milhões de crianças (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>). Nos países desenvolvidos, em cada 1000 crianças 1 nasce surda e um terço da população acima dos 65 anos é afetada (Marziano *et al.*, 2003;

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>). A surdez é considerada a terceira maior doença sensorial crónica do mundo, prevendo-se um aumento de 25% até ao ano 2020 (Riaz e Iqbal, 2012).

Do ponto de vista clínico, a surdez pode ser classificada de acordo com a idade de aparecimento dos primeiros sintomas, o grau, a origem e o tipo, conforme se descreve de seguida (Kochhar *et al.*, 2007).

2.1. Idade

A perda de audição pode ocorrer em qualquer idade e pode ser classificada como congénita ou adquirida (Petit *et al.*, 2001). No primeiro caso, o indivíduo manifesta os sintomas logo no nascimento. No segundo caso, o indivíduo começa a apresentar perdas auditivas sempre em idade tardia. Caso se manifeste após o desenvolvimento da fala denomina-se por surdez pós-lingual, caso surja antes designa-se por surdez pré-lingual (Kochhar *et al.*, 2007).

2.2. Grau

Para a avaliação do grau de severidade é importante saber que o som pode ser medido através da intensidade (medida em dB) e da sua frequência (medida em Hz). Desta forma, um indivíduo que apresente num audiograma uma perda de som entre os 21-40 dB é classificado como tendo uma surdez ligeira; com uma perda entre 41-70dB como moderada, severa com 71-95dB e profunda se a perda for superior a 95dB (Fig. 2). A perda de dB é medida quer para baixas, médias e altas frequências através de audiogramas como os que são representados na figura seguinte (Cryns *et al.*, 2004).

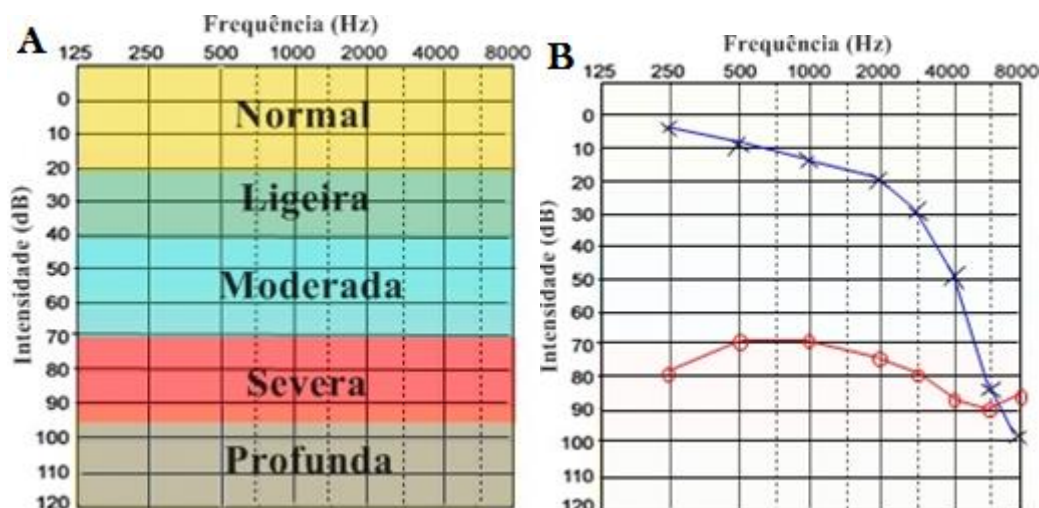


Fig. 2. Representação do audiograma. A – Audiograma com os diferentes graus de surdez consoante a perda de dB. B – Exemplo de um audiograma de um indivíduo com surdez severa nas altas frequências no ouvido esquerdo (linha azul) e com surdez moderada a severa no ouvido direito (linha vermelha).

2.3. Origem

As causas da surdez podem ser ambientais, genéticas ou uma combinação de ambas (Petit *et al.*, 2001).

Um dos exemplos dos fatores ambientais etiologicamente associados à surdez podem ser as infecções pré e pós-natais. Durante o período de gestação podem surgir embriopatias causadas por infecções virais (Herpes, rubéola, *citomegalovirus*, etc.) que podem levar a malformações no feto, e também à perda auditiva do mesmo (Petit *et al.*, 2001). O vírus citomegálico é considerado a causa mais comum de infecções congénitas nos países desenvolvidos, podendo afetar 0,2% a 2% dos recém-nascidos (Almeida *et al.*, 2010). Após o nascimento podem surgir ainda casos de meningite igualmente implicados nesta anomalia sensorial (Kochhar *et al.*, 2007). Outros fatores como a prematuridade, fármacos ototóxicos, elevada exposição ao ruído e traumas são considerados causas da surdez (Morton. e Nance, 2006).

Os fatores genéticos também estão na origem das várias formas da surdez, muitas vezes associados a vários síndromes nomeadamente a síndrome de Usher, Pendred, entre outros. Todavia, a maioria dos casos de surdez genética está associada a uma hereditariedade autossômica recessiva não-sindrômica, onde a falta de audição é a única patologia presente (Morton. e Nance, 2006).

Finalmente, alguns casos de surdez podem ainda apresentar como causa uma etiologia ambiental e genética. Um dos exemplos mais conhecidos deste tipo de perda auditiva resulta do produto de uma mutação no DNA mitocondrial e da toma de antibióticos ototóxicos pertencentes à família dos aminoglicósidos. A mutação mitocondrial causa suscetibilidade para esses antibióticos, levando à surdez progressiva do indivíduo (Kochhar *et al.*, 2007).

2.4. Tipo de surdez

Existem três tipos de classificação da surdez – surdez de condução, neurosensorial ou mista – que variam em função da zona afetada no ouvido (Kochhar *et al.*, 2007).

A surdez de condução deve-se a alterações do ouvido externo e/ou ouvido médio que afetam a condutância do som ao longo do canal auditivo, desde o pavilhão externo até ao tímpano (Petit *et al.*, 2001; Paul e Whitelaw, 2011)

Na surdez neurosensorial, a região afetada é o ouvido interno, mais precisamente a cóclea, o nervo auditivo ou ambas as estruturas (Paul e Whitelaw, 2011). Neste tipo de surdez, o som é corretamente conduzido até à cóclea embora não ocorra a conversão do som em sinais elétricos (impulsos nervosos). Deste modo, a condução dos impulsos nervosos através dos nervos auditivos é inibida (Rehm *et al.*, 2003). Uma surdez mista resulta da associação de uma surdez neurosensorial e condutiva.

Assim, para uma melhor caracterização do tipo de surdez associada a cada indivíduo, é necessário a distinção, *a priori*, das diferentes formas de surdez (genética ou adquiridas/não-genéticas). Para tal, é importante efetuar um diagnóstico que deverá incluir audiogramas, exames otológicos e físicos, historial familiar e análises genéticas (Kochhar *et al.*, 2007).

3. Estudos Genéticos

A investigação com base em estudos genéticos e moleculares tem permitido grandes avanços na área da surdez. Estima-se que a etiologia de mais de 50% dos casos de surdez seja genética e que, cerca de 60% dos indivíduos com perda auditiva apresentam um modo de transmissão monogénica, com uma ou várias mutações num só gene (Cryns *et al.*, 2004, Snoeckx e Camp, 2007). No entanto, a transmissão digénica da surdez e as suas formas multifatoriais, que se devem a vários genes e à sua interação com o ambiente têm vindo a ser estudadas (Riaz e Iqbal, 2012).

A perda de audição hereditária pode ser denominada por síndrónica, caso um indivíduo apresente, para além da surdez, outras características ou alterações específicas de uma síndrome (Willems, 2000). Porém, a maioria dos casos (cerca de 70%) está associada a uma surdez não-sindrónica (Snoeckx *et al.*, 2005). Da surdez não-sindrónica, aproximadamente 80% apresentam hereditariedade autossómica recessiva (DFNB), 17% hereditariedade autossómica dominante (DFNA) enquanto que, numa minoria (1-2%) a causa da patologia está localizada no cromossoma X (DFN) e em genes mitocondriais (Snoeckx *et al.*, 2005).

Estudos na área da genética molecular conseguiram identificar cerca de 170 loci associados a surdez não-sindrónica, com mais de 60 genes identificados até à data (The connexin and deafness homepage; Minami *et al.*, 2012)

O locus DFNB1 localizado no cromossoma 13q11-12 está associado à surdez neurosensorial não-sindrónica autossómica recessiva e caracteriza-se por uma manifestação pré-lingual, ou seja, antes do desenvolvimento da fala (Rodriguez-Paris *et al.*, 2011). Deste locus fazem parte dois genes – o *GJB2* e *GJB6*, pertencentes ao mesmo *cluster* que codificam individualmente duas proteínas transmembranares – a conexina 26 e a conexina 30, respetivamente, essenciais no processo auditivo (Rodriguez-Paris *et al.*, 2011; Crispino *et al.*, 2011).

4. Conexinas e junções comunicantes – Estrutura e função

As conexinas são uma família de proteínas transmembranares que são expressas na maioria dos tecidos dos vertebrados superiores (Ambrosi *et al.*, 2013). As duas conexinas mencionadas ao longo deste capítulo são ambas expressas na cóclea, entre as células ciliadas e têm um papel fundamental no processo auditivo (Rodriguez-Paris *et al.*, 2011).

Existem pelo menos 21 conexinas diferentes na espécie humana e quase todas as células do corpo expressam pelo menos uma delas em alguma fase do desenvolvimento (Mese *et al.*, 2007). No genoma humano existem mais de 20 genes que codificam conexinas e quando ocorrem mutações nestes genes a audição pode ser comprometida, podendo levar à surdez profunda ou congênita (Marziano *et al.*, 2003). A presença de mutações nas conexinas está associada a diversas doenças para além da perda de audição, como é o caso de doenças neurológicas, doenças de pele e cataratas (Kalmatsky *et al.*, 2012).

Existem duas nomenclaturas diferentes para cada conexina. Uma das formas de classificação é referente à massa molecular da proteína, expressa em kDa, como por exemplo, a conexina 26 que apresenta 26 kDa. A outra nomenclatura considera 4 a 5 grupos representados por símbolos gregos (α , β , γ , δ e ϵ) baseados em considerações evolutivas e homologia das sequências, sendo dela um exemplo a designação *GJB2* ou junção comunicante beta-2 referente à Conexina 26 (Mese *et al.*, 2007; Ambrosi *et al.*, 2013). Os membros da família das conexinas apresentam a mesma topologia, sendo um bom exemplo a conexina 26 ilustrada esquematicamente na fig. 3. Têm nove domínios, os quais consistem no domínio amino terminal (-NH₂), domínio carboxilo terminal (-COOH), dois *loops* extracelulares, um *loop* citoplasmático e quatro domínios transmembranares (Martínez *et al.*, 2009).

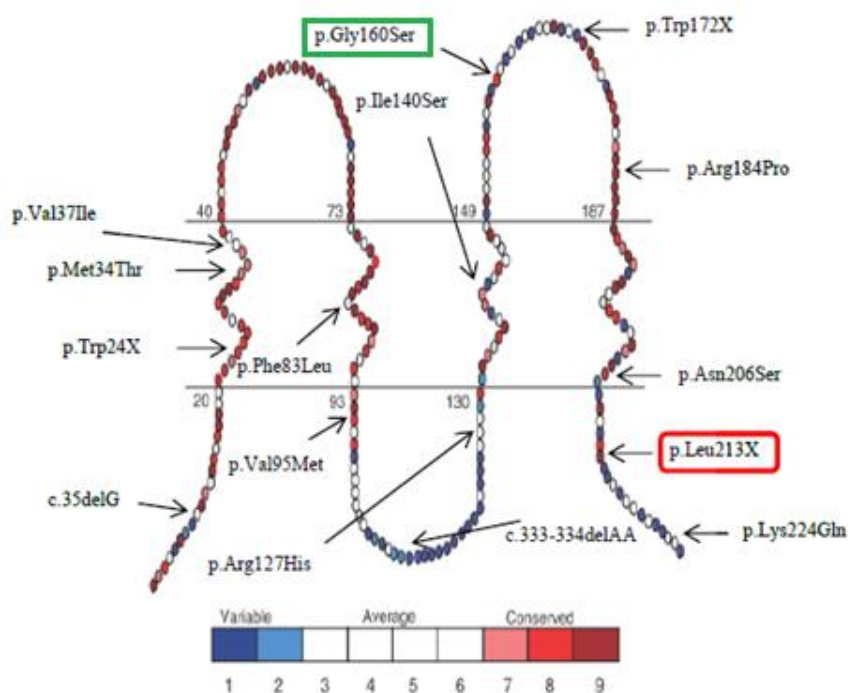


Fig. 3. Representação da cadeia de aminoácidos da conexina 26 com mutações. Setas identificam os locais das várias mutações associadas ao *GJB2*. Na caixa a verde temos o exemplo da mutação p.Gly160Ser (ou c.478G>A) e na caixa a vermelho a mutação p.Leu213X (ou c.638T>A). O índice de cores representa os vários níveis de conservação dos aminoácidos da Cx26. Imagem adaptada de Gonçalves *et al.*, 2013.

As regiões mais conservadas nesta família de proteínas são os *loops* extracelulares. Pensa-se que tal acontece, devido ao facto destas regiões estarem envolvidas no *docking* das proteínas, processo necessário à formação dos canais intercelulares (Dahl *et al.*, 1996). As regiões mais distintas entre as diferentes conexinas são o *loop* citoplasmático e a região C-terminal, que podem variar quer na sequência, quer no comprimento. Estas regiões são as mais suscetíveis de serem modificadas pós-traducionalmente, por exemplo, através de fosforilações, acreditando-se que têm um importante papel regulatório ainda desconhecido (Mese *et al.*, 2007). Por sua vez, através da técnica de cristalografia, verificou-se que a região N-terminal da proteína faz parte da estrutura do poro do canal intercelular (Ambrosi *et al.*, 2013)

4.1. Conexina 26

A conexina 26 (Cx26) também chamada de proteína de junção comunicante beta-2 é a conexina mais frequentemente mutada associada a casos de surdez. É uma proteína de 26 kDa, com 226 aminoácidos, codificada pelo gene *GJB2* (Minárik *et al.*, 2003). É expressa na cóclea ao nível das células de suporte do órgão de Corti e dos tecidos conetivos e pensa-se ter um papel essencial na reciclagem dos iões K⁺ (Batissoco *et al.*, 2009).

O gene *GJB2* é um gene pequeno com cerca de 5500 pb de comprimento, com dois exões, estando a região codificante contida totalmente no exão 2 (Falah *et al.*, 2012). Este gene foi o primeiro a ser mapeado em estudos de surdez e é considerado o alvo mais frequente de mutações associadas sobretudo a surdez autossómica recessiva (Willems, 2000). Apesar de existir um grande número de genes envolvidos na surdez, sabe-se que até 50% dos casos de surdez neurosensorial autossómica recessiva são devidos à presença de mutações no *GJB2* (Matos *et al.*, 2007).

Neste gene estão descritas cerca de 110 mutações recessivas distintas (mutações *nonsense*, *missense*, *splicing*, deleções e *frameshift*) que podem levar à produção de proteínas truncadas ou proteínas não funcionais (The connexin and deafness homepage, Julho de 2014; Crispino *et al.*, 2011). Contudo, a maioria das mutações ligadas ao gene *GJB2* são alterações de bases nucleotídicas e deleções (Ambrosi *et al.*, 2013).

O tipo e a frequência das mutações são fortemente influenciados pela distribuição geográfica das populações. Na população caucasiana, a mutação c.35delG é a mais comum, caracterizada pela deleção de uma guanina no nucleótido 35. Esta mutação origina um *frameshift* no início da proteína, o qual resulta na terminação prematura desta (Cryns *et al.*, 2004). A proteína resultante desta mutação está truncada, apresentando apenas 12 aminoácidos, sendo o 13º um codão STOP (Scott *et al.*, 1998).

Outras mutações são mais frequentes em outras populações. Temos o caso da c.167delT predominante entre Judeus Ashkenazi, caracterizada por originar uma proteína truncada devido à deleção de uma T na posição 167, enquanto que a mutação c.235delC é encontrada entre Asiáticos, e

caracterizada por uma deleção de uma C na posição 253 no domínio transmembranar 2 (Rabionet *et al.*, 2000; Snoeckx *et al.*, 2005). Outro exemplo ainda é a mutação p.R143W, mais frequente em Africanos, onde uma T é substituída por uma C na primeira posição do codão 143, dando origem a um aminoácido não-conservativo, uma arginina em vez de um triptofano (Brobbly *et al.*, 1998; Snoeckx *et al.*, 2005).

4.2. Conexina 30

A conexina 30 (Cx30), também denominada por proteína da junção comunicante beta-6, é codificada pelo gene *GJB6* com 10430 pb, localizado a montante do *GJB2*, no locus DFNB1 (Battissoco *et al.*, 2009). Tal como a Cx26, a Cx30 forma canais iónicos intercelulares. A Cx30 é uma proteína ligeiramente maior que a Cx26, contendo 261 aminoácidos (Grifa *et al.*, 1999).

No gene *GJB6*, ao contrário do que acontece com o gene *GJB2*, existem poucas mutações descritas. Até à data foram identificadas oito mutações sendo que, duas delas se encontram associadas a outras doenças (The connexin and deafness homepage, Julho de 2014; Dinh *et al.*, 2010). Das restantes, quatro são ligadas à surdez (T5M, 63delG, G11R e A88V) e duas das mais importantes mutações correspondem a duas grandes deleções, uma de 309 kb, a del(*GJB6*-D13S1830) e outra de 232 kb, a del(*GJB6*-D13S1854) (Dinh *et al.*, 2010; del Castillo *et al.*, 2005; Rodriguez-Paris *et al.*, 2011). Estas duas deleções deletam o gene *CRYL1*, o exão 1 e 2 do gene *GJB6*, e deletam ainda a sequência compreendida entre ambos os genes (del Castillo *et al.*, 2005) (Fig. 4).

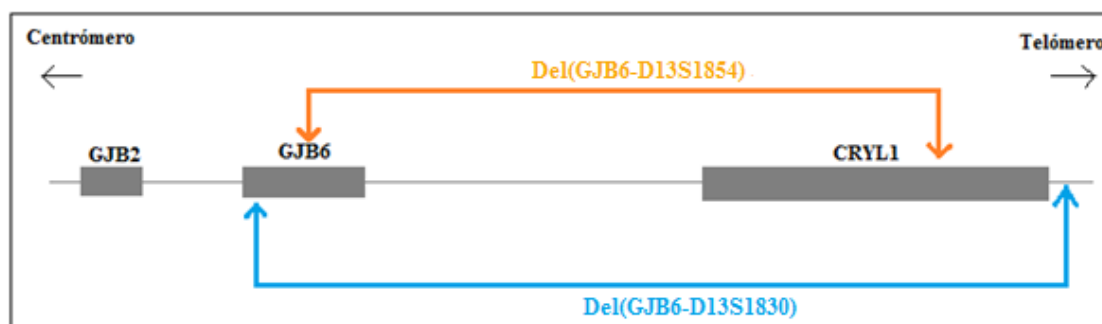


Fig. 4. Região do cromossoma 13q11-12 com a localização das deleções relativamente aos genes *GJB2*, *GJB6* e *CRYL1*. A deleção del(*GJB6*-D13S1830), com 309 kb, representada a azul e a del(*GJB6*-D13S1854), com 232 kb, representada a laranja. Imagem adaptada de Rodriguez-Paris *et al.*, 2011.

A del(*GJB6*-D13S1830) e a del(*GJB6*-D13S1854) podem ser encontradas em indivíduos surdos, quer em homozigotia, quer em heterozigotia composta, uma com a outra ou com mutações no gene da Cx26 (del Castillo *et al.*, 2005). Deste modo, pensa-se que a explicação mais plausível será que a perda de audição poderá estar associada a uma interação digénica, ou então estas deleções poderão remover alguma região regulatória do *GJB2*, ainda não identificada. Caso a segunda hipótese seja mais provável,

poderá ocorrer assim, o silenciamento do gene da Cx26 a nível da transcrição, não causando qualquer efeito ou distúrbio no gene *GJB6* (Rodriguez-Paris *et al.*, 2011).

As conexinas associam-se em canais hexaméricos, formando os conexões ou hemicanais como mostra a fig. 5 (Marziano *et al.*, 2003). A oligomerização das seis conexinas ocorre progressivamente, desde o retículo endoplasmático até ao final do Golgi (Mese *et al.*, 2007).

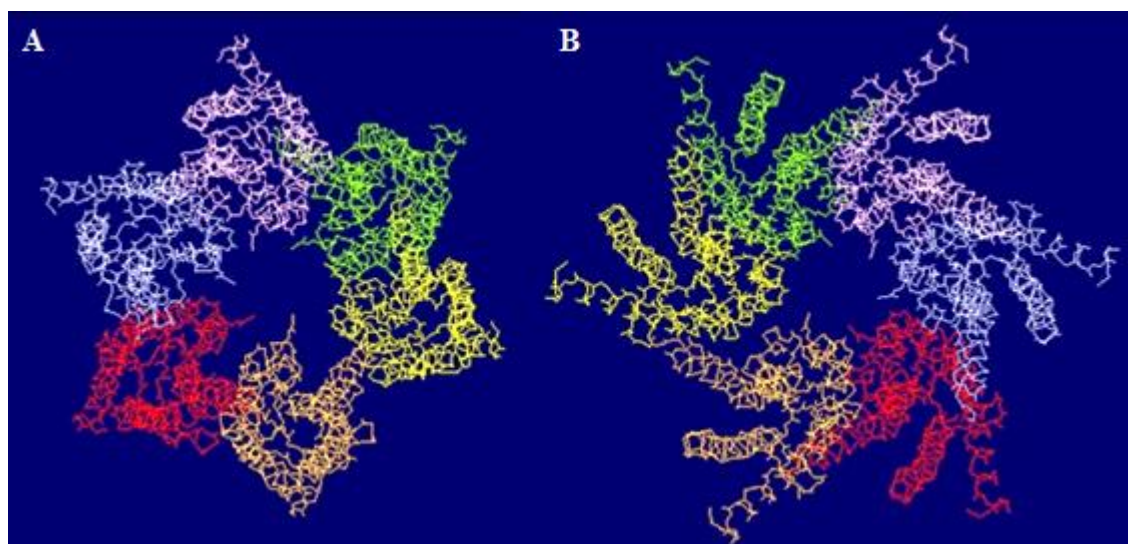


Fig. 5. Estrutura tridimensional dos conexões formados por conexina 26. Conjunto de seis conexinas formam um conexão. Cada cor representa uma conexina diferente. A – Vista do canal do lado extracelular. B – Vista do canal do lado citoplasmático. Imagem obtida através do programa SPDBV, modelo 2zw3.

Após a sua síntese, os conexões são modificados pós-traducionalmente e empacotados em vesículas da membrana do Golgi de forma a serem corretamente conduzidos até à membrana (Qu *et al.*, 2009). Por fim, ocorre o *docking* na membrana celular de cada célula adjacente, possibilitando um contacto entre ambos na mesma região formando-se um poro intercelular (Martínez *et al.*, 2009). Os canais intercelulares têm um tempo de semi-vida de 1 a 6 horas, desde a sua formação até à sua degradação (Qu *et al.*, 2009).

Os conexões quando compostos por 6 subunidades de conexinas idênticas designam-se por homoméricos e por heteroméricos quando compostos por subunidades de conexinas diferentes (Yum *et al.*, 2007). As propriedades fisiológicas da associação de diferentes conexinas não são totalmente conhecidas. No entanto, sabe-se que alteram as características do canal que formam, quer o tamanho e a carga, quer as propriedades regulatórias do mesmo (Marziano *et al.*, 2003).

A comunicação intercelular é um processo fundamental na homeostasia do organismo multicelular, uma vez que lhe permite responder aos estímulos e às alterações ambientais, permitindo ainda regular processos como o crescimento, a proliferação e diferenciação celular (Machado-Santelli e Ionta, 2012; Mese *et al.*, 2007). Um tipo de comunicação conhecido entre células é mediado através de

canais intercelulares que estão dispostos em regiões especializadas da membrana plasmática para formar junções comunicantes (Mese *et al.*, 2007).

As junções comunicantes são estruturas essenciais ao normal funcionamento fisiológico dos organismos. Facilitam a comunicação intercelular entre células adjacentes, permitindo a troca de pequenos íons, mensageiros secundários (cAMP, ATP, etc.) e metabolitos (aminoácidos, açúcares, etc.) até aproximadamente 1000 Da (Martínez *et al.*, 2009). O tamanho e a carga das moléculas capazes de atravessar os canais vai depender da composição do canal da junção comunicante, uma vez que este apresenta permeabilidade seletiva, dependente das conexinas que o compõem (Mese *et al.*, 2007).

As junções comunicantes podem ser denominadas por homotípicas ou heterotípicas (Fig. 6) consoante resultem da associação de conexões iguais ou distintos, respetivamente (Marziano *et al.*, 2003).

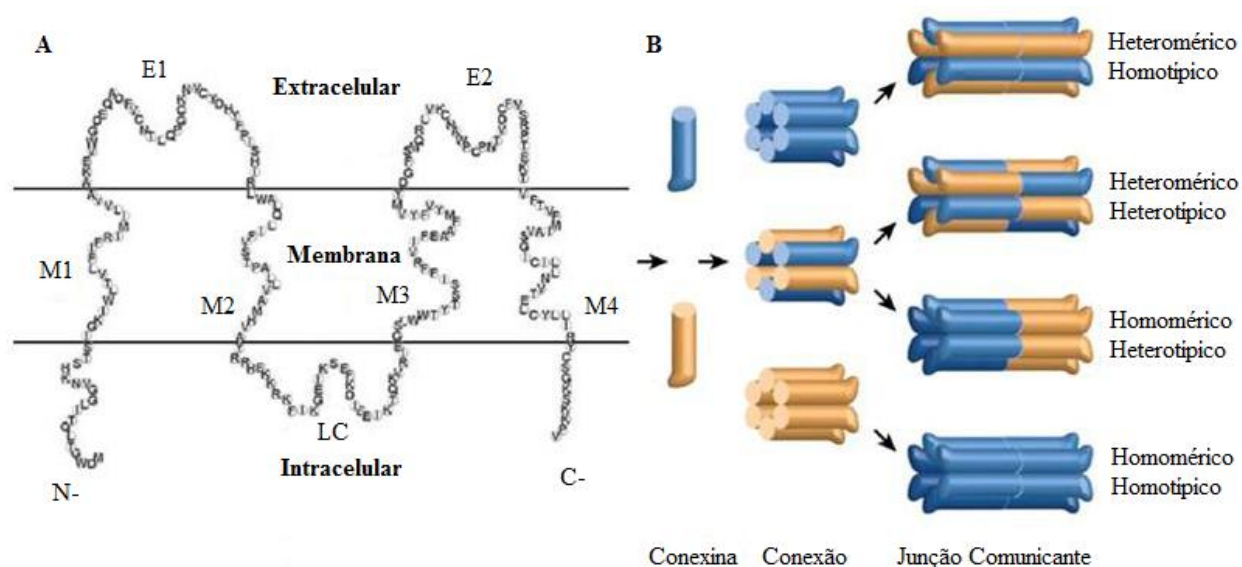


Fig. 6. Representação esquemática das conexinas, conexões e junções comunicantes. A – Conexina com dois *loops* extracelulares (E1 e E2), quatro domínios transmembranares (M1, M2, M3 e M4), um *loop* citoplasmático (LC) e duas extremidades (N- e C-terminal). B – Hexâmero de conexinas formando um conexão. Associação de dois conexões para formação de junções comunicantes. Associação de diferentes conexinas possibilita diferentes arranjos a nível dos conexões e das junções comunicantes. Imagem adaptada de Mese *et al.*, 2007.

A distribuição das junções comunicantes ao longo do ouvido interno possibilita a manutenção da homeostasia coclear (Rodriguez-Paris *et al.*, 2011). Esta distribuição é fundamental pois permite a recirculação de íons potássio para a endolinfa (D'Andrea *et al.*, 2002). Desta forma, pode-se entender a importância das conexinas e de todas as estruturas implicadas na audição, e perceber como as mutações nos genes *GJB2* e *GJB6* que codificam estas proteínas podem levar à perda auditiva.

5. Estudos Funcionais

A maioria das proteínas (cerca de 90% das proteínas totais da célula) necessita de adquirir a sua estrutura tridimensional de modo a cumprir a sua função biológica (Hartl e Hayer-Hartl, 2009). O *folding* de uma proteína é um processo através do qual uma cadeia polipeptídica adquire a sua conformação tridimensional. Esta conformação é possível devido a um conjunto de ligações entre átomos da cadeia principal e átomos das cadeias laterais de aminoácidos (Alberts *et al.*, 2008). As proteínas podem ser designadas por *misfolded* quando sofrem alterações na cadeia polipeptídica, originando estruturas aberrantes, causando efeitos negativos e consequentemente perturbações no normal funcionamento biológico do homem (Alberts *et al.*, 2008; Tapan e Subhankar, 2006).

Os sistemas vivos desenvolveram estratégias para controlar a expressão de proteínas anormais em células, através da reparação ou degradação das mesmas, como esquematizado na fig. 7. Proteínas com *folding* incorreto são marcadas e detetadas por um mecanismo de controlo da qualidade da célula. Este mecanismo é mediado por *chaperones* moleculares que reconhecem sinais estruturais expostos por proteínas *misfolded*. As proteínas são ubiquitinadas e quando detetadas são enviadas para uma via proteolítica de modo a serem degradadas no citoplasma por proteossomas (Dobson, 2003).

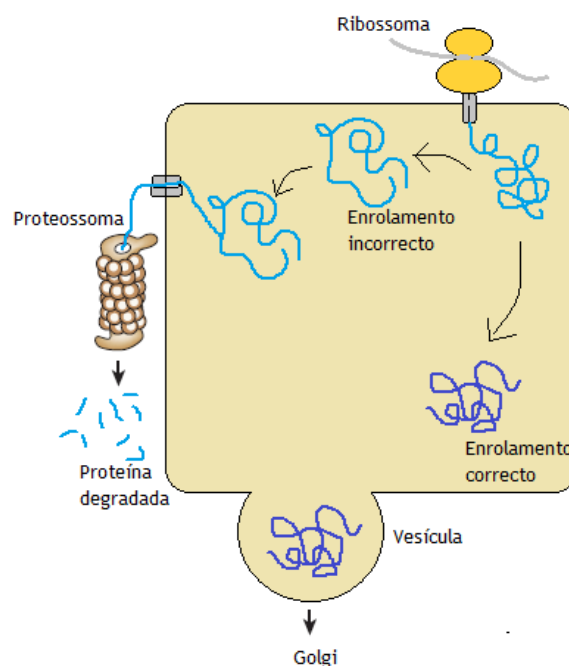


Fig. 7. Esquema de processamento de proteínas no retículo endoplasmática. Proteínas com *folding* correto são transportadas para o Golgi. As proteínas que não apresentam uma estrutura tridimensional normal são reconhecidas por um mecanismo de controlo celular, que as encaminha para uma via proteolítica onde são ubiquitinadas e consequentemente degradadas nos proteossomas. Imagem adaptada de Dobson, 2003.

De forma a podermos caracterizar as proteínas resultantes das mutações do gene *GJB2* é necessário recorrer aos estudos funcionais das mesmas. O primeiro passo dos estudos funcionais *in vitro* é reconstituir a sequência selvagem e as mutações da Cx26 num sistema heterólogo, através da transfeção de linhagens celulares que não expressem esta proteína de forma endógena. Deste modo, termos uma célula que expresse apenas o DNA inserido e desejado por nós (Dinh *et al.*, 2010).

Através de plasmídeos de expressão com a sequência de interesse (neste estudo com a Cx26), marcada com um anticorpo específico é possível detetá-la na célula, *in vitro*, através de técnicas de imunofluorescência e localizar a sua posição no interior célula, avaliando assim o seu tráfego celular.

Algumas mutações, já conhecidas no gene *GJB2*, podem ser agrupadas em classes diferentes (Ver fig. 8) de acordo com o seu defeito funcional, esperando que mutações da mesma classe consigam beneficiar da mesma estratégia de terapêutica e reparação (Amaral e Farinha, 2013).

5.1. Classe I – Ausência de proteína

Fazem parte desta classe mutações que inibem a biossíntese proteica. As mutações da classe I inibem a tradução e a produção de proteínas devido, por exemplo, a mutações *nonsense* que originam codões STOP prematuramente, ou devido a outras alterações que afetam locais de *splicing*. São caracterizadas por estarem geralmente associadas a fenótipos mais graves pois resultam na ausência total da proteína na célula (Amaral e Farinha, 2013).

5.2. Classe II – Ausência de tráfego celular

As mutações pertencentes a esta classe inibem o tráfego celular. Mutações na cadeia aminoacídica podem provocar erros no enrolamento da proteína, devido à diferente interação entre os aminoácidos, podendo levar à retenção da proteína no retículo endoplasmático e posteriormente, à sua rápida degradação em proteossomas.

A mutação p.W24X e a p.I35S são exemplos deste grupo. A primeira resulta na alteração de um aminoácido por um codão STOP, na posição 24. Obtém-se assim, uma proteína apenas com 24 aminoácidos em vez dos 226 aminoácidos normais da sequência selvagem. A segunda mutação promove a alteração de uma treonina por uma serina. Apesar desta alteração só diferir num grupo metilo, a proteína originada vai adquirir uma conformação proteica diferente que a leva a ficar retida no citoplasma, não migrando para a membrana, acabando por ser eliminada pela própria célula (Mani *et al.*, 2009).

5.3. Classe III – Ausência de função

As mutações desta classe inibem a função das proteínas, quando estas estão inseridas na membrana a formar canais. As alterações podem causar perda de permeabilidade dos canais. Esta perda de permeabilidade pode ocorrer devido à diminuição do tamanho do poro do canal iónico (p.S26L), ou devido a um efeito dominante-negativo da mutação em relação à proteína selvagem (p.R75W). Este efeito dominante-negativo sobre a Cx26 pode diminuir ou mesmo inibir a atividade normal do canal (Oh, S. *et al.* 1997; Mani *et al.*, 2009).

Neste caso concreto, temos o exemplo da mutação p.R75W que apresenta um tráfego celular correto até ao local da membrana, embora apresente defeitos na sua função enquanto canal. Quando esta sequência mutada é co-expressa com a conexina selvagem, não há um resgate do fenótipo mutante, mas sim um efeito dominante negativo sobre a proteína selvagem, inibindo o funcionamento do canal iónico (Mani *et al.*, 2009).

5.4. Classe IV – Menor função

As mutações desta classe não prejudicam a tradução da proteína, nem o tráfego celular. As conexinas originadas acabam por migrar corretamente para a membrana, dando origem a canais iónicos. No entanto, estes apresentam uma atividade funcional reduzida. Um exemplo desta classe, é a mutação p.Met34Thr.

A mutação p.Met34Thr, também denominada por c.101T>C, é caracterizada pela substituição de um aminoácido na posição 34 da cadeia polipeptídica (Skerrett *et al.*, 2004). A mutação p.Met34Thr reduz significativamente a atividade funcional dos canais devido a defeitos elétricos e metabólicos dos canais de baixa condutância (D'Andrea *et al.*, 2002; Massimiliano *et al.*, 2006).

5.5. Classe V – Menor expressão de Proteína

Esta classe engloba mutações que promovem baixos níveis de expressão de conexina. Elas originam baixos níveis de mRNA e consequentemente produzem proteínas em menor quantidade, através de *splicing* alternativo causado (Amaral e Farinha, 2013).

5.6. Classe VI – Menor estabilidade

Por último, temos a classe VI da qual fazem parte as mutações que causam diminuição da estabilidade da proteína à superfície da célula. A mutação p.W172R consiste numa substituição de um triptofano por uma arginina, a qual resulta na ausência de função de canal da Cx26 mutada. Esta alteração ocorre no *loop* extracelular (Mani *et al.*, 2009). Assim, pensa-se que a ausência de função poderá ter a ver com o resultado de um incorreto *docking* dos hemicanais à membrana.

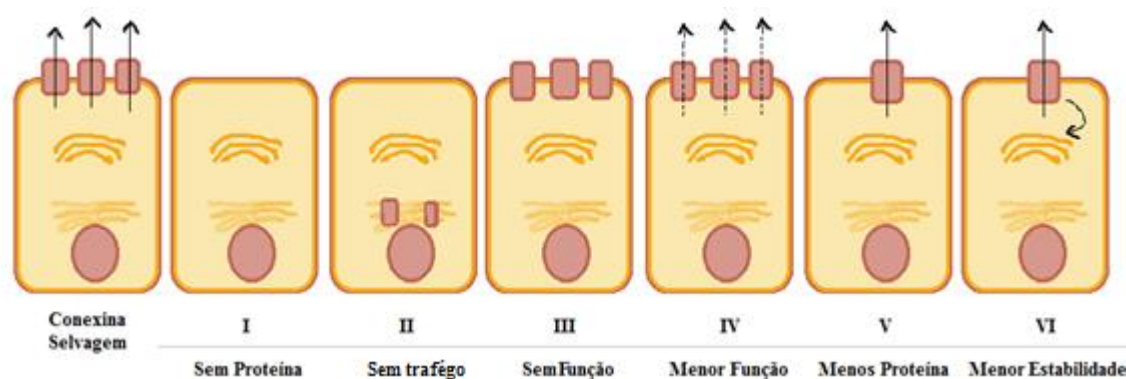


Fig. 8. Esquema das classes de mutações das conexinas. A primeira imagem do lado esquerdo representa uma célula a expressar conexina selvagem. As restantes imagens representam células a expressar mutações pertencentes a diferentes classes funcionais.

5.7. As mutações p.Leu213X, p.Gly160Cys e p.Gly160Ser

Para além das várias mutações mencionadas anteriormente, existem muitas outras implicadas na perda auditiva. Mutações *frameshift* e outras mutações que levam à produção parcial da Cx26 representam cerca de 28% das mutações totais do *GJB2*. A maioria das mutações da Cx26, aproximadamente 79%, são categorizadas em mutações pontuais, originadas por substituições de bases nucleotídicas ou por deleção *in frame* na sequência da conexina (Dinh *et al.*, 2010).

A p.Leu213X, também denominada por c.638T>A, é uma mutação recessiva que se localiza na extremidade C-terminal. Esta mutação origina um códon STOP prematuro e consequentemente poderá formar uma proteína truncada, com os 14 últimos aminoácidos ausentes comparativamente com a

sequência normal da conexina 26 (226 aminoácidos). Esta mutação é caracterizada pela alteração do codão 213 (TTG), que codifica a leucina, por um codão STOP (TAG) (Gonçalves *et al.*, 2013).

A p.Leu213X está localizada num resíduo de aminoácido altamente conservado no domínio C-terminal da proteína. Uma vez que a região C-terminal é variável dentro da família das conexinas, pensa-se que este domínio pode estar associado a processos regulatórios (Gonçalves *et al.*, 2013).

A p.Gly160Ser ou c.478G>A é uma mutação que se localiza no segundo domínio extracelular da Cx26. Caracteriza-se pela alteração de uma base nucleotídica na posição 478 do DNA, onde uma guanina é substituída por uma adenina, originando consequentemente a troca de uma glicina (GGC) por uma serina (AGC) (Scott *et al.*, 1998).

A mutação p.Gly160Cys ou c.478G>T é semelhante à anterior, uma vez que se localiza no mesmo *loop* e que a alteração da base é no mesmo nucleótido. Porém, a guanina é substituída por uma timina. O aminoácido originado é então, uma cisteína (TGC). Tanto a serina, como a cisteína, que substituem a guanina na posição 478, são dois aminoácidos polares que podem participar na formação de ligações iónicas afetando a estrutura da conexina. A glicina, aminoácido presente na sequência selvagem, é um aminoácido neutro apolar, incapaz de formar estas ligações. Deste modo, pensa-se que esta alteração contribua de alguma forma para a alteração da estrutura tridimensional da Cx26 (Watson *et al.*, 1987).

6. Objetivos

Ao longo deste trabalho foram definidos dois objetivos. Um dos objetivos consiste em caracterizar geneticamente as famílias portuguesas no locus DFNB1 e contribuir, deste modo, para o diagnóstico molecular dos indivíduos através da identificação da etiologia genética da surdez.

O segundo objetivo consiste em caracterizar funcionalmente, a nível celular, as mutações p.Leu213X, p.Gly160Ser, p.Gly160Cys associadas a surdez, existentes no gene *GJB2*. Pretende-se com este trabalho perceber que alterações causaram as mutações nas conexinas expressas de uma forma exógena nas células. Para além da caracterização das mutações, pretende-se ainda localizar, em células Hela, as mutações mencionadas anteriormente.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Caraterização da população em estudo

Neste estudo testaram-se dois tipos de populações. Uma é composta por 28 indivíduos, provenientes de 19 famílias diferentes. Dos 28 indivíduos, 14 foram previamente identificados como surdos (Probandos). Os restantes 14 são familiares dos probandos. Os pacientes foram acompanhados e direcionados através do Centro Hospitalar Lisboa Norte (Santa Maria), Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (Egas Moniz), Hospital Garcia da Orta e Hospital CUF Descobertas. Para além da colheita de sangue, foram fornecidos audiogramas e a história clínica de forma a auxiliar no diagnóstico genético. Todos os indivíduos assinaram um consentimento informado e, no caso de indivíduos menores, a assinatura foi recolhida aos seus representantes legais.

Além das famílias acima referenciadas, testou-se ainda 399 amostras de recém-nascidos de Portugal Continental e das ilhas, constituindo a segunda população em estudo. Contrariamente à população anterior, esta não apresentava qualquer informação adicional, pessoal ou clínica, sendo caracterizada por ser uma amostragem aleatória da população.

De modo a evitar-se qualquer quebra do anonimato, todos os indivíduos foram codificados por letras do alfabeto e números. Cada família tem um código específico e cada amostra da população aleatória de Portugal é devidamente identificada consoante o distrito ou região de onde foi recolhida como observado na tabela 1.

Tabela 1. População aleatória de Portugal. Códigos atribuídos às amostras dos indivíduos consoante a região ou o distrito onde foram recolhidas.

População aleatória de Portugal	
Código	Distrito/Região
AAC	Açores
ANO	Norte
AAL	Algarve
ALE	Alentejo
AFA	Faro
ALX	Lisboa
APO	Porto
AVC	Viana do castelo
ABR	Braga
ABG	Bragança
AAV	Aveiro
AVR	Vila Real

O cruzamento código/nome só existe junto das informações pessoais de cada indivíduo sendo uma informação à parte de qualquer componente laboratorial.

2. Extração de DNA genómico a partir de amostras de sangue

O DNA genómico foi extraído a partir de amostras de sangue obtidas em:

- Tubos de sangue periférico contendo EDTA, um agente anticoagulante. Os tubos foram armazenados a -20°C. O DNA genómico foi conseguido utilizando o JetQuick® Blood and Cell Culture Kit (GENOMED) de acordo com as respetivas instruções do fabricante em Anexo B.

- Cartões *Guthrie*, recolhidas dos indivíduos à nascença, através de uma picada no pé. Os cartões foram armazenados à temperatura ambiente.

O protocolo de extração de DNA a partir de cartões *Guthrie* segue os seguintes passos: Recorta-se 1 cm² do cartão em pequenos quadrados com cerca de 1 mm². O cartão agora recortado é colocado em microtubos de 1,5 mL. Ao microtubo, são adicionados 500 µL de tampão DLB (1 mL de Tris/HCL 1M pH=7,4; 0,2 mL de NaCl 5M; 2 mL de EDTA 0,5 M pH=8,0; 96,8 mL de H₂O), 50 µL de SDS (10%) e 5 µL de Proteinase K (20mg/mL). Os microtubos foram colocados a uma temperatura de 56°C, durante a noite, com agitação leve.

Seguidamente adicionou-se 20 μL de NaCl (5M) e 575 μL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico nas proporções 25:24:1, respetivamente. Agitou-se a mistura por sucessivas inversões. Centrifugou-se durante 3 min, a 12000 rpm de forma a separar-se a solução em duas fases distintas, recuperando-se a fase superior para um novo microtubo.

Adicionou-se 575 μL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e voltou-se a centrifugar durante 3 min, a 12000rpm. Recuperou-se uma vez mais a fase superior para um novo microtubo, ao qual se adicionou 1 mL de etanol (96%) guardado a -20°C , deixando-se a mistura obtida a incubar também à temperatura de -20°C , durante 1 hora.

Após incubação, centrifugou-se durante 15 min, a 4°C e 12000rpm. Descartou-se o etanol e deixou-se secar o precipitado à temperatura ambiente. Por último, adicionou-se 100 μL de água ultra pura para reidratar o DNA e incubou-se durante a noite, a 56°C .

Para verificar se ambas as extrações de DNA (tubos de sangue e cartões *guthrie*) ocorreram com sucesso, as bandas do mesmo foram observadas num gel de eletroforese.

3. Amplificação por Polimerase Chain Reaction (PCR) do gene *GJB2*

Para amplificar as regiões de DNA pretendidas, como é o caso da região do exão 2 do *GJB2*, utilizou-se a técnica de PCR. Para cada PCR foi adicionado um controlo negativo, sem qualquer DNA, que foi utilizado para confirmar a presença/ausência de contaminantes nos reagentes da mistura de PCR.

Os *primers* utilizados estão devidamente identificados na tabela 2. Utilizou-se o Termociclador Biometra T Personal e os produtos amplificados por PCR foram observados num gel de agarose 1% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen), em tampão TBE 0,5X através de uma eletroforese, como descrito mais abaixo.

Tabela 2. Primers do PCR utilizados para amplificação do exão 2 do *GJB2*. Primers com a respetiva sequência, temperatura de *melting* e tamanho dos fragmentos que amplificam.

Nome do primer	Sequência	T _m	Dimensão do fragmento
2AF	5'-AAGTCTCCCTGTTCTGTCCT-3'	60,7°C	928pb
2BR	5'-GGCATCTGGAGTTTCACC-3'		

Para cada reação utilizou-se como reagentes tampão 5X, um *primer forward* (2AF) a 10 μM , um *primer reverse* (2BR) a 10 μM , 5U/ μL de *Taq Polimerase* (My Taq, Citomed) que na sua composição inclui dNTPs e MgCl_2 , água ultra pura estéril e DNA, perfazendo um volume total de 50 μL . O programa utilizado foi o indicado na tabela 3.

Tabela 3. Programa de PCR do gene *GJB2*

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	94°C	1 min
30	94°C	1 min
	60,7°C	1 min
	72°C	1 min
1	72°C	7 min

4. Amplificação por PCR multiplex do gene *GJB6*

Para além do gene *GJB2*, também foram analisadas amostras para a deteção de duas grandes deleções presentes no gene *GJB6*, outra causa de surdez não-sindrômica. O objetivo foi detetar as deleções del(*GJB6*-D13S1830) e del(*GJB6*-D13S1854) no gene *GJB6*. Para tal, utilizou-se três pares de *primers* que foram adicionados à mistura da reação, permitindo a deteção simultânea de ambas as deleções através de um PCR multiplex.

Na tabela 4 estão representados, por esta ordem, os seguintes pares de *primers*: *primers* responsáveis pela amplificação do exão 1 do *GJB6*, *primers* responsáveis pela deteção da deleção del(*GJB6*-D13S1854) e *primers* responsáveis pela deteção da deleção del(*GJB6*-D13S1830).

Tabela 4. Pares de *primers* com a respetiva sequência, temperatura de *melting* e tamanho dos fragmentos amplificados do gene *GJB6*

Nome do <i>primer</i>	Sequência	T _m	Dimensão do fragmento
Cx30 Ex1A	5' CGTCTTTGGGGGTGTTGCTT 3'	60°C	333pb
Cx30 Ex1B	5' CATGAAGAGGGCGTACAAGTTAGAA 3'		
Del BK1	5' TCATAGTGAAGAACTCGATGCTGTTT 3'	60°C	564pb
Del BK2	5' CAGCGGCTACCCTAGTTGTGGT 3'		
<i>GJB6</i> – 1R	5' TTTAGGGCATGATTGGGGTGATTT 3'	60°C	460pb
BKR-1	5' CACCATGCGTAGCCTTAACCATTTT 3'		

Para além do três pares de *primers* que estavam a uma concentração de 10 µM, utilizou-se ainda para a mistura da reação, tampão 5X, 5 U/µL de *Taq polymerase* (My taq, Citomed), água ultra-pura estéril e DNA nas seguintes condições indicadas na tabela 5.

Tabela 5. Programa de PCR multiplex do gene *GJB6*

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	5 min
5	94°C	40 seg
	60°C	40 seg
	Diminui 1°C por ciclo (baixando até aos 56°C)	
25	94°C	40 seg
	55°C	40 seg
1	72°C	7 min
	4°C	∞

5. Eletroforese de Produtos de PCR

Todos os produtos de PCR foram observados em eletroforese, em gel de agarose 1% (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen), em tampão TBE 0,5X. Foi utilizado brometo de etídio como agente intercalante do DNA, este último visualizado à luz UV. O gel foi fotografado através do sistema fotográfico *Cleaver Scientific Ltd.* e tratado com o software *PhotoScape*.

O marcador utilizado para comparar o tamanho dos fragmentos de DNA foi o 1 Kb Plus (Invitrogen) e o 1 Kb Plus GeneRuler (BioPortugal). O *loading buffer* utilizado foi uma solução de 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno de cianol, 10mM de Hidróxido de Sódio e 95% de Formamida (Lara *et al.*, 2012.).

6. Purificação dos Produtos de PCR

Para que seja possível sequenciar o exão 2 do gene *GJB2* e detetar as mutações é necessário recorrer à purificação dos produtos de PCR. A purificação permite eliminar todos os componentes necessários ao método do PCR como os *primers*, enzima, tampão e outros fragmentos de DNA. Esta eliminação é necessária para evitar que estes componentes possam eventualmente hibridar inespecificamente, interferindo com a sequenciação do DNA.

Utilizou-se o JetQuick® Spin Column PCR Purification Kit (GENOMED) seguindo o respetivo protocolo do kit em anexo B. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, como descrito no subcapítulo 5. A eletroforese permitiu observar a pureza do DNA e verificar que a concentração deste nas bandas do gel é ideal para sequenciação. Esta característica é reconhecida através da intensidade das bandas, por comparação com a intensidade de outras que servem de exemplo-padrão, no protocolo do *kit* utilizado.

7. Sequenciação

Após purificação, as amostras foram enviadas para a empresa comercial STAB Vida. As sequências foram analisadas através do software Chromas 2.4 e comparadas com a sequência padrão através do programa BLAST do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

A sequenciação foi feita em duas direções e sempre que necessário foi repetida, de modo a eliminar-se possíveis ruídos presentes, no início e no final da sequência da região codificante do gene *GJB2*.

8. Cultura celular

As células utilizadas neste estudo foram as células HeLa. Estas células pertencem a linhagens celulares de mamíferos provenientes de um carcinoma cervical. São células epiteliais capazes de crescer *in vitro*, aderentes à superfície de frascos e conseguem ser transferidas após a sua dissociação. Estas linhagens celulares foram preferidas para os estudos funcionais, uma vez que a expressão endógena de conexinas está ausente.

Para o crescimento e manutenção das células foi utilizado o meio de cultura CO₂-independent Medium (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco) e 1% de 200mM L-Glutamina (Gibco). As células foram mantidas numa estufa a 37°C sem CO₂. O meio é constituído por nutrientes (proteínas, vitaminas, fatores de crescimento, etc.) que mimetizam as condições *in vivo*, permitindo às células crescerem e manterem o pH e a osmolaridade. A adição do soro permite ainda estimular o crescimento e a diferenciação celular. O meio de cultura foi escolhido uma vez que a estufa não possuía CO₂. Este meio apresenta um sistema tampão com β -glicerofosfato e bicarbonato de sódio que aumenta a produção e utilização de CO₂ por parte das células. Deste modo, não foi necessária uma fonte exógena para manutenção das funções celulares dependentes de CO₂.

As células cresceram ao longo da superfície interna dos frascos, aderentes e dispostas em monocamada. Após atingirem uma densidade celular equivalente a uma confluência de 80%, aproximadamente, recorreu-se a passagens, ou seja, a cultura celular foi passada para novos frascos através do processo de tratamento com tripsina.

Para as passagens, removeu-se o meio do frasco de cultura. As células foram lavadas duas vezes com PBS. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de tripsina, uma enzima proteolítica responsável pela dissociação das células, devido à clivagem das ligações proteicas entre a matriz do frasco e a monocamada celular. A temperatura ótima da tripsina é de 37°C e uma vez que ela está armazenada à temperatura ambiente, após adição de tripsina à cultura, esta foi incubada durante 5 min na estufa a

37°C. Por último, adicionou-se 5 mL de meio independente de CO₂ previamente suplementado para ressuspender as células e neutralizar a tripsina ainda presente.

8.1 Congelamento das células

A cultura celular pode ser mantida através de passagens e dividida em novos frascos ou pode ser armazenadas a -80°C para posterior utilização. O processo de congelamento começou com lavagens com PBS para remoção dos resíduos de meio ainda presentes nos frascos. Seguidamente, para que as células se destacassem do frasco, adicionou-se tripsina com um volume variável consoante o tamanho/área do frasco utilizado (0,5 mL no caso dos frascos T25 e 1,5 mL para os T75).

As células suspensas foram passadas para um microtubo de 1,5 mL. Centrifugou-se a 1500 g, durante 5 minutos de forma a criar um *pellet* e a eliminar a tripsina no sobrenadante que se descartou. Ressuspendeu-se o *pellet* em meio de congelamento preparado com 95% de FBS (Gibco) e 5% de DMSO. As células foram congeladas de forma lenta, enroladas em papel de laboratório e colocadas em suportes de esferovite, guardadas a -80°C, para que mantivessem a sua viabilidade celular.

8.2. Descongelamento das células

Descongelou-se um microtubo de células guardadas a -80°C, em banho-maria a 37°C. É fundamental que o descongelamento seja rápido de forma a manter a integridade das células. Após descongelamento, centrifugou-se cada microtubo durante 5 minutos a 1500 g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado de forma a eliminar-se a maioria do DMSO, um composto tóxico para as células, quando em grandes concentrações. O *pellet* foi ressuscitado, ainda no microtubo, com aproximadamente 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% de FBS (Gibco) e 1% de 200mM L-glutamina (Gibco). Foi transferido para um frasco de cultura (T25) onde se adicionou mais 3 mL de meio de forma a perfazer o volume adequado ao crescimento da cultura celular.

9. Clonagem de Cx26

Utilizou-se o plasmídeo pCMV6-XL5 (ORIGENE) que continha o cDNA da Cx26 inserido (Ver fig. 9). Para confirmar a homologia do cDNA inserido no vetor, com a sequência selvagem da conexina 26 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004004.3), amplificou-se, purificou-se e sequenciou-se o cDNA. Para tal, foram utilizados os *primers* VP1.5 (*Forward*): 5' GGACTTTCCAAAATGTCG 3' e XL39 (*Reverse*): 5' ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3', fornecidos pela empresa.

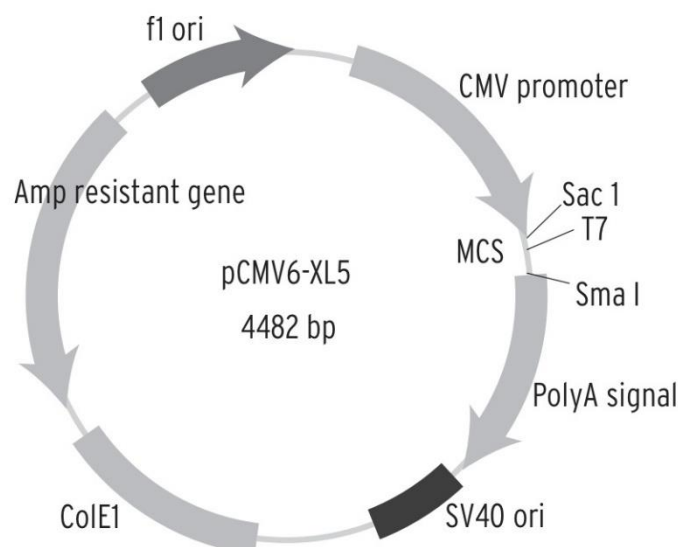


Fig. 9. Diagrama do vetor pCMV6-XL5. O vetor pCMV6-XL5 tem 4,5 kb, aproximadamente. O *cDNA* é inserido no MCS entre as enzimas de restrição que o compõem. A seleção do plasmídeo em *E.coli* é conferida através do gene de resistência à ampicilina. Retirado de <http://www.origene.com/cdna/trueclone/vectors.mspx>.

Foram transformadas bactérias competentes GCL5 α , uma estirpe de *E.coli*, de modo a obter-se uma grande concentração de DNA. As bactérias competentes apresentam a capacidade de integrar o nosso vetor pCMV6-XL5 e crescem rapidamente. As GCL5 α foram colocadas a crescer em placas e após crescimento, recorreu-se a mini e medi-preparações (Ver subcapítulo 9.4) e fez-se stocks de DNA. Para além de DNA, fez-se ainda stocks do plasmídeo clonado inserido nas bactérias e armazenou-se a -80°C.

9.1. Mutagénese dirigida (*Site-directed mutagenesis*)

Introduziu-se uma mutação pontual de uma base nucleotídica na sequência selvagem da Cx26 (clonada num vetor de expressão pCMV6-XL5). Foram criadas três mutações diferentes em três sequências selvagens, através da técnica de mutagénese dirigida, utilizando o NZYmutagenesis kit® (NZYTech).

O método é bastante eficaz e resume-se a uma reação de PCR, com dois *primers* complementares a cada uma das sequências. Estes *primers* contêm as mutações desejadas na região central, flanqueada por bases não modificadas (ver anexo E).

A DNA polimerase (NZYProof®, NZYTech) estende os *primers* em ambos os sentidos, gerando um plasmídeo mutante por PCR, nas condições indicadas na tabela 6.

Tabela 6. Programa de PCR da mutagénese dirigida

Ciclos	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 min
18	95°C	1 min
	60°C	1 min
	68°C	1.5 min/kb do plamideo
1	68°C	15 min

Para se comprovar a eficiência da mutagénese utilizou-se um plasmídeo de controlo de mutagénese – pNZY28 de 2.88 kb, e uma mistura de *primers* específicos providos pelo Kit NZY Mutagenesis® (NZYTech). Este plasmídeo contém um codão STOP (TAA) inserido no gene *lacZα*, em vez de conter o codão CAA que codifica para uma glutamina e que aparece normalmente na 9ª posição da enzima β-galactosidase. Assim, caso o PCR tenha ocorrido com sucesso, os *primers* do controlo reverterão o codão STOP inserido no plasmídeo num codão funcional. O objetivo deste controlo foi produzir colónias azuis em placa, após transformação, confirmando a eficiência da mutagénese durante o PCR (processo descrito no subcapítulo seguinte).

O DNA mutado amplificado após mutagénese foi visto em gel de agarose (1%) e hidrolisado, posteriormente, com enzima DpnI (uma endonuclease específica para DNA metilado e hemimetilado). Esta enzima remove o DNA plasmídico parental, ou seja, a sequência que serviu de molde à nova cadeia sintetizada para que se possa proceder à transformação ([http://www.prozomix.com/uploaded/PROMB01201%20\(NZYMutagenesis%20kit\).pdf](http://www.prozomix.com/uploaded/PROMB01201%20(NZYMutagenesis%20kit).pdf)).

Para além do Kit NZY Mutagenesis® (NZYTech), utilizou-se anteriormente o QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

9.2. Bactérias competentes (DH5α)

Produziram-se bactérias competentes de *E.coli* a partir de uma estirpe não competente – DH5α. Durante todo o procedimento, foi fundamental manter as bactérias em gelo, junto da chama de forma a criar condições ótimas para a sua viabilidade.

Para a produção das bactérias riscou-se uma placa com DH5α em meio LA e colocou-se na estufa a 37°C, durante a noite. Inoculou-se no dia seguinte uma colónia isolada da placa em 5 mL de meio LB e colocou-se novamente a crescer, a 37°C com agitação, durante a noite.

No dia seguinte, reinoculou-se a cultura, em 1/100. Retirou-se 100 µL da cultura crescida do dia anterior e colocou-se a crescer em 10 mL de meio LB, a 37°C, a 200 rpm até se atingir um OD₆₀₀ entre 0,3 e 0,4.

Foram feitos stocks de alíquotas de bactérias DH5 α . Passou-se 1,5 mL da cultura para um microtubo e centrifugou-se a 12000 rpm, durante 30 seg. Descartou-se o sobrenadante. O *pellet* foi ressuscitado em 100 μ L de TSS no gelo (Ver em Anexo A). As bactérias foram armazenadas a -80°C e a 4°C durante um máximo de 6 horas, de forma a serem utilizadas no mesmo dia para transformação, não perdendo a capacidade de competência durante este período de tempo (Chung *et al.*, 1989).

9.3 Transformação

O processo de transformação foi realizado antes e depois da mutagénese dirigida. Antes da mutagénese a transformação foi feita com a sequência de DNA selvagem, inserida no vetor de expressão pCMV6-XL5. Depois da mutagénese a transformação foi feita com as sequências de DNA já mutadas.

9.3.1 Transformação do DNA selvagem

Foram utilizadas as bactérias GCL5 α . As bactérias foram retiradas do congelador a -80°C e colocadas em gelo, de forma a descongelarem gradualmente. Ainda no gelo, adicionou-se 100 ng de DNA selvagem clonado a um microtubo de 100 μ L de bactérias competentes e, paralelamente, adicionou-se 1 μ L do plasmídeo PRZA18 (0,1 ng/ μ L) a um outro microtubo com 100 μ L das mesmas bactérias, como controlo positivo do processo de transformação. Agitou-se suavemente para garantir que o DNA ficava homogeneamente distribuído pelo restante conteúdo. Deixou-se 30 minutos no gelo, agitando-se delicadamente de 15 em 15 min.

Após este tempo de espera, deu-se um choque térmico, colocando os microtubos num banho-maria a 42°C durante 45 seg para permeabilizar a membrana das bactérias, permitindo a passagem do DNA para o seu interior. Seguidamente, os microtubos foram colocados em gelo, durante 2 minutos, para que a integridade da membrana das bactérias fosse novamente restabelecida. Adicionou-se 600 μ L de meio NZY⁺ sem qualquer antibiótico, pré-aquecido a 42°C, em banho-maria (Ver em Anexo A a composição). As bactérias foram deixadas a crescer nos microtubos durante 1 h, a 37°C com agitação.

Posteriormente, retirou-se 100 μ L de cada microtubo e espalhou-se em placas com meio LA e ampicilina a 100ng/ μ L (LA+AMP). Os restantes 600 μ L foram centrifugados, descartando-se 500 μ L do sobrenadante. Com os restantes 100 μ L, ressuscitou-se o *pellet* e inoculou-se novas placas de LA+AMP, procurando-se assim obter um maior número de colónias transformadas, caso as obtidas no primeiro inóculo fossem insuficientes.

9.3.2 Transformação do DNA mutado

Depois do processo de mutagénese dirigida fez-se uma outra transformação, mas agora com o DNA mutado. O DNA mutado foi hidrolisado pela DpnI. Este DNA já tratado foi adicionado a um microtubo com 100 μ L de células competentes NZYStar® (NZYTech). De forma a comprovar-se a eficiência da transformação, paralelamente, adicionou-se a um outro microtubo de células

supercompetentes, 1 μL do plasmídeo de controlo da transformação (0,1 ng/ μL). As bactérias já com o DNA foram agitadas levemente nos microtubos. Deixou-se cada microtubo 30 min no gelo. Para afetar a estabilidade da membrana e permitir a entrada do DNA no interior das células, colocou-se o microtubo em banho-maria a 42°C, durante 45 seg, de forma a proporcionar um choque térmico para permeabilizar a membrana celular.

Voltou a colocar-se o microtubo no gelo, durante 2 min, para que a estabilidade da membrana fosse reconstituída. Adicionou-se 0,6 mL de meio NZY⁺ previamente aquecido a 42°C e deixou-se a mistura com as células a incubar durante 1 h, a 37°C com agitação.

Foram preparadas dois tipos de placas cerca de 30 min antes do final do procedimento de transformação. Uma placa continha meio LA e ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$ (LA+AMP) onde foram colocadas a crescer as bactérias transformadas. As outras placas continham o mesmo meio com ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$, tetraciclina 15 $\mu\text{g/mL}$ e ainda 100 μL de IPTG 10mM (NZYTech), previamente preparado com dH₂O estéril e 100 μL de X-Gal 2% (NZYTech), preparado com dimetilformamida. A estas últimas placas adicionou-se o conteúdo do microtubo que continha o plasmídeo controlo da mutagénese, de forma a serem observadas no dia seguinte, colónias azuis. Uma vez que a mutagénese ocorreu com sucesso, o gene da β -galactosidase não estava interrompido. Deste modo, a enzima foi produzida e clivou o X-gal que se encontrava no meio, produzindo a cor azul.

Após 1 h de incubação, retirou-se 100 μL de cada microtubo que foram espalhados nas placas anteriores. O restante volume (600 μL) foi centrifugado e descartou-se 500 μL do sobrenadante, restando ainda 100 μL . Estes 100 μL serviram para ressuspender o *pellet*, inoculando-se as bactérias em placas de LA+AMP.

Após transformação, 4 colónias foram picadas de cada placa e inoculadas em 5 mL de LB líquido com 5 μL de ampicilina a 100 $\mu\text{g/mL}$, durante 16 h a 37°C com agitação.

Este procedimento foi também repetido para outra estirpe de *E.coli*. Para além das bactérias competentes NZYStar® (NZYTech), foram transformadas ainda, as bactérias supercompetentes XL1-Blue (Stratagene), e as DH5 α . No entanto, a eficiência de transformação foi bastante baixa, não se obtendo transformantes suficientes.

9.4 Mini e Medi-Preparação do plasmídeo

O DNA plasmídico da sequência selvagem e o DNA plasmídico das sequências mutadas foram preparados a partir de 4 colónias isoladas em placas. As colónias foram cultivadas em tubos com 5 mL de meio LB com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), a 37°C, durante 6 horas. Retirou-se 3 mL para um microtubo (1,5 mL de cada vez). Centrifugou-se a cultura à temperatura ambiente, a 12000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e removeu-se o máximo de meio que se conseguiu. Utilizou-se o kit de minipreparações

(NZYMiniprep®, NZYTech) de forma a purificar-se o DNA plasmídico e o respetivo protocolo em Anexo B. Antes da realização das Medi-preparações (Ver Anexo B), sequenciou-se o DNA, para se confirmar a existência das alterações nucleotídica induzidas na mutagénese dirigida, ou seja a sequência de DNA desejada.

9.5 Transfeção celular

Para a transfeção utilizou-se células HeLa incubadas a 37°C, em frascos de cultura T25 com uma confluência entre 80-90%, num meio CO₂-independent (Gibco) suplementado com 10% de FBS (Gibco) e 1% de L-Glutamina (Gibco). Recorreu-se à lavagem das células com PBS e posteriormente, após este ser descartado, adicionou-se 0,5 mL de Tripsina como já descrito no subcapítulo da Cultura Celular.

Após tratamento com tripsina, adicionou-se 5 mL de meio de cultura devidamente suplementado de forma a ressuspender suavemente as células, isolando-as dos aglomerados que formam. Adicionou-se ainda ao frasco T25, mais 15 mL de meio, perfazendo um total de 20 mL. Destes 20 mL, colocou-se 1 mL em cada poço de placa *microwell* de 6 poços e incubou-se a 37°C, para o dia seguinte, de modo a que as células estejam aderentes ao fundo.

Foram feitas duas *mix* independentes:

- Num microtubo adicionou-se 95 µL de Opti-MEM® Reduced Serum Medium (Gibco) com 5 µL de Lipofectamina® 2000 (Invitrogen™) por cada poço utilizado (*Mix* de 100 µL por poço). Foram utilizados 8 poços. Deixou-se repousar 5 min.

- Em microtubos separados, tantos quanto o número de poços a transfetar, colocou-se 100 µL de Opti-MEM® Reduced Serum Medium e adicionou-se 1 µg e 2 µg de DNA mutado e DNA selvagem.

As duas *mix* foram juntas. Juntou-se 100 µL da *mix* Opti-MEM® com Lipofectamina®, a cada microtubo que continha o Opti-MEM® e o DNA respetivo de cada poço. Incubou-se durante 20 min à temperatura ambiente.

Durante a incubação da *mix*, as células foram tratadas com duas lavagens com Opti-MEM®, de modo a remover-se o meio de cultura presente em cada poço. A última lavagem prolongou-se até aos 20 min de incubação da *mix* referida anteriormente.

Seguidamente, retirou-se o Opti-MEM® dos poços que foram alvo da transfeção. Adicionou-se a cada microtubo com a *mix* mais 300 µL de Opti-MEM®. Agitou-se. Transferiu-se seguidamente, todo o volume (cerca de 500 µL) de cada microtubo para cada poço respetivo da placa *microwell*. Incubou-se a 37°C, durante 6 h.

Após as 6 h, mudou-se o meio de cada poço, substituindo-se o Opti-MEM® por meio de cultura regular suplementado. Incubou-se uma placa durante 24h e outra durante 48h, a 37°C, para garantir que as células tivessem tempo de expressar a Cx26.

As células transfectadas foram, posteriormente, utilizadas para *Western blot* e para uma imunofluorescência, descritas nos dois subcapítulos seguintes. Para a imunofluorescência, a transfeção foi realizada segundo este protocolo descrito, porém as células foram cultivadas em lamelas colocadas nos poços das placas *microwell* de 6 poços.

10. Expressão e localização subcelular da Cx26:

10.1 *Western Blot*

10.1.1 Géis de proteínas (SDS-PAGE)

Para quantificar de forma relativa a conexina 26 realizou-se um *western blot*. Para tal, as amostras foram devidamente preparadas. Foram utilizadas células com 24 e 48h após transfeção.

Retirou-se o meio de cada poço e fez-se duas lavagens rápidas com PBS. Retirou-se o PBS e adicionou-se 200 µL de tampão de amostra (Ver anexo A). Com o auxílio de raspadores, removeu-se as células aderentes ao fundo de cada poço. Com uma seringa com agulha de 22 G ressuspendeu-se 10 vezes o meio viscoso, com as células, transferindo-o para um microtubo. Já no microtubo, voltou a ressuspender-se com uma agulha de calibre mais estreito, de 27 G quebrando o DNA mecanicamente. As amostras foram guardadas a -20°C até serem novamente utilizadas.

Foram preparados dois géis. Um gel de separação de acrilamida 12,5% e um outro gel de concentração de acrilamida 4% segundo o Anexo A. A percentagem do gel de separação vai depender do tamanho da proteína que queremos fazer migrar, neste caso, a conexina 26 apresenta 26 kDa, logo a percentagem ideal será 12,5%. Primeiramente, polimerizou-se o gel de separação no sistema de eletroforese, cobrindo-se com água destilada para acelerar o processo de polimerização. Em seguida, retirou-se a água destilada e polimerizou-se o gel de concentração com o respetivo pente, de forma cuidadosa para evitar a formação de bolhas de ar, por cima do gel anterior já polimerizado.

Antes de aplicadas nos poços, as amostras foram desnaturadas em placas a 95°C, durante 5 min. Após desnaturação, foram adicionados 40 µL de cada amostra aos poços e 5 µL de marcador (Protein Marker II®, NZYTech). As amostras correram a 60 V durante a fase de concentração, e a 100 V durante a fase de separação, durante um total de 2 h.

10.1.2 Transferência de proteínas

Depois de separadas eletroforéticamente, as proteínas devem ser transferidas para uma membrana de PVDF. Para tal, submergiu-se a membrana de PVDF em metanol durante 2 min e em

seguida submergiu-se em H₂O durante 5 min. A transferência foi realizada durante 90 min, a 400 mA, em condições de refrigeração. O gel proveniente da eletroforese anterior é colocado em contacto com a membrana de PVDF e ambos foram colocados entre duas folhas de papel de filtro e duas esponjas embebidas em tampão de transferência formando uma cassette, como indica a figura II.2. As proteínas a transferir apresentam carga negativa, uma vez que estão ligadas ao SDS. Como tal, a cassette deverá ser colocada de forma a que a corrente passe do polo negativo (cátodo) para o polo positivo (ânodo), fazendo com que as proteínas migrem devidamente do gel para a membrana.



Fig. 10. Esquema da transferência da proteína do gel para a membrana de PVDF. Imagem adaptada de <http://www.abcam.com/>

Após transferência fez-se 3 lavagens colocando a membrana em PBST (0,1% (v/v) de Tween 20 em PBS) durante 10 min cada. Seguidamente, bloqueou-se a membrana com 10 mL de uma solução contendo 5% (p/v) de leite desnatado em PBST durante 1 h. Seguidamente, cortou-se a membrana em duas partes, de forma a incubar-se cada metade com um anticorpo diferente.

Utilizou-se um anticorpo primário para a Cx26 (Connexin 26 N-19 policlonal, goat, IgG, Santa Cruz Biotechnology, INC) e um anticorpo primário para a α -tubulina (Anti-Alpha-tubulin1 T5168, Sigma). Esta última é uma proteína de 50 kDa que é expressa endogenamente nas células HeLa e que serve de controlo para *western blot* (Ver anexo C). Foram utilizados ainda anticorpos secundários, um para a deteção do anticorpo primário anti-Cx26 (goat, anti-rabbit, IgG, 166-2408, BioRAD) e um para a deteção do anticorpo primário anti- α -tubulina (Goat, Anti-mouse, IgG, 170-6516, BioRAD), ambos conjugados com a peroxidase HRP.

Diluiu-se o anticorpo primário anti-Cx26 (1:500 e 1:100) em 5% (p/v) de leite desnatado em PBST (12 mL). Colocou-se a metade da membrana que continha a banda do marcador com igual peso molecular à Cx26 a incubar durante a noite, a 4°C com leve agitação. A outra metade da membrana foi incubada com anticorpo primário (1:30000) anti- α -tubulina, diluído em 5% (p/v) de leite desnatado em PBST.

No dia seguinte, lavou-se a membrana 3 vezes com PBST durante 5 min. Diluíram-se ambos os anticorpos secundários (1:3000) em duas soluções diferentes com 5% (p/v) de leite desnatado em PBST (12 mL) e incubou-se durante 1 h, à temperatura ambiente. Lavou-se novamente 3 vezes com PBST durante 5 min para retirar o excesso de anticorpo de modo a obter-se a revelação das bandas.

10.1.3 Revelação e quantificação da intensidade das bandas

No procedimento de revelação da membrana, juntou-se 1 mL de Peroxide Solution e 1 mL de Luminol/enhancer solution (Clarity™ Western ECL, BioRAD) Colocou-se as metades das membranas sobre uma película transparente e sobre esta adicionou-se a mistura de reagentes de forma a obtermos a revelação no Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+System (BioRAD).

10.2. Imunofluorescência

Para a imunofluorescência, cultivou-se células transfectadas em lamelas dispostas em poços de placas *microwell* como descrito no subcapítulo 9.5. De forma a seleccionar-se apenas células que incorporaram realmente o DNA através do processo de transfecção estável, adicionou-se a cada poço 1 µL de ampicilina (100 µg/mL). Desta forma, foram seleccionadas apenas células capazes de sintetizar a Cx26, uma vez que o vetor onde estava contido o DNA, apresentava esta marca de selecção.

Após a transfecção celular, lavou-se duas vezes as células com PBS 1X, com 2 mL por poço. Fixou-se as lamelas em 1% de paraformaldeído em PBS 1X (1 mL por poço) durante 10 min à temperatura ambiente com agitação.

Seguidamente, lavou-se as lamelas com PBS 1X, de forma breve. Bloqueou-se as células com 2% de BSA em PBS 1X (1 mL) durante 30 min à temperatura ambiente. Lavou-se duas vezes as células com PBS 1X.

Diluiu-se o anticorpo primário (Connexin 26 N-19 policlonal, Santa Cruz Biotecnology, INC) numa diluição de 1:10 em BSA 1% (v/v). Cortou-se uma película de Parafilme e adicionou-se um total de 320 µL (40 µL por cada lamela) do anticorpo diluído, em forma de gotas em cima da película. Retiraram-se as lamelas dos poços da placa *microwell* e incubou-se as lamelas com a face voltada para baixo de forma a que as células contactassem com o anticorpo primário. As lamelas foram incubadas a 4°C com o anticorpo primário, durante a noite, num ambiente húmido.

No dia seguinte, as lamelas foram novamente passadas para as placas *microwell*, com a face agora novamente voltada para cima. Fez-se 3 lavagens de 5 min cada com PBS 1X.

Diluiu-se o anticorpo secundário (Alexa Fluor 568, Goat, anti-rabbit, Molecular Probes) acoplado a um fluorocromo juntamente RNase, Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Molecular Probes) e To-Pro®-3 (Molecular Probes) em BSA 2% (v/v) em PBS 1X. O anticorpo secundário é anti-conexina,

enquanto que a Phalloidin e o To-Pro®-3 intercalam, respetivamente, com a actina filamentosa (F-actina) e o núcleo.

Cortou-se outra película de Parafilme e colocou-se agora 40 µL da *mix* de anticorpo secundário. As lamelas foram retiradas cuidadosamente dos poços e colocados sobre as gotas com a face voltada para baixo durante 30 min. Seguidamente, lavou-se com PBS 1X.

As lamelas foram montadas em lâminas, com uma gota de propilgalato-glicerol-PBS seladas com verniz. Foram observadas ao microscópio de fluorescência.

III. RESULTADOS

1. Famílias com surdez – Análise do gene *GJB2* e *GJB6*

Fez-se a análise do gene *GJB2* e do gene *GJB6* em 28 amostras de sangue provenientes de 19 famílias assistidas no Centro Hospitalar Lisboa Norte (Santa Maria), Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (Egas Moniz), Hospital Garcia da Orta e no Hospital CUF Descobertas.

1.1. Análise do gene *GJB2*

A análise ao exão 2 do gene *GJB2* foi o primeiro passo para a identificação de eventuais mutações e para a determinação da causa genética de surdez das famílias. Recorrendo à sequenciação do gene *GJB2* dos probandos e dos restantes familiares, obtiveram-se os seguintes resultados, representados em eletroforetogramas (Fig. 11/ Fig.12/ Fig. 13/ Fig. 14):

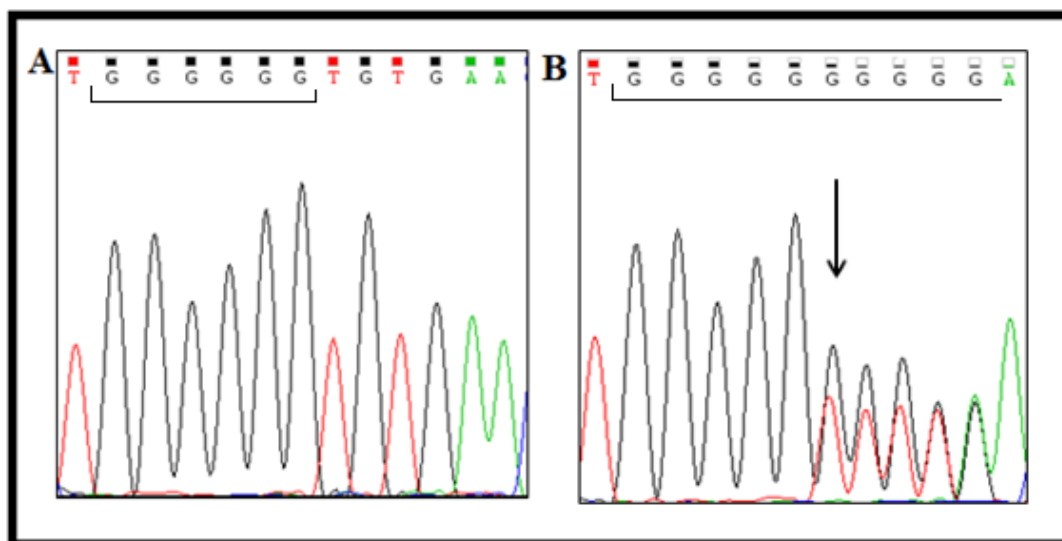


Fig. 11. Eletroforetograma da sequência mutada com c.35delG em heterozigotia. A – Eletroforetograma de um indivíduo controlo com sequência selvagem com 6 picos de Guaninas. B – Sequência do indivíduo PK1 com mutação c.35delG em heterozigotia.

O indivíduo PK1 apresenta a mutação c.35delG em heterozigotia. No eletroforetograma consegue-se observar a deleção de uma G, comparativamente à sequência selvagem. Esta mutação encontra-se em heterozigotia, pois toda a sequência seguinte ao nucleótido na posição 35 está sobreposta à sequência do outro alelo não mutado.

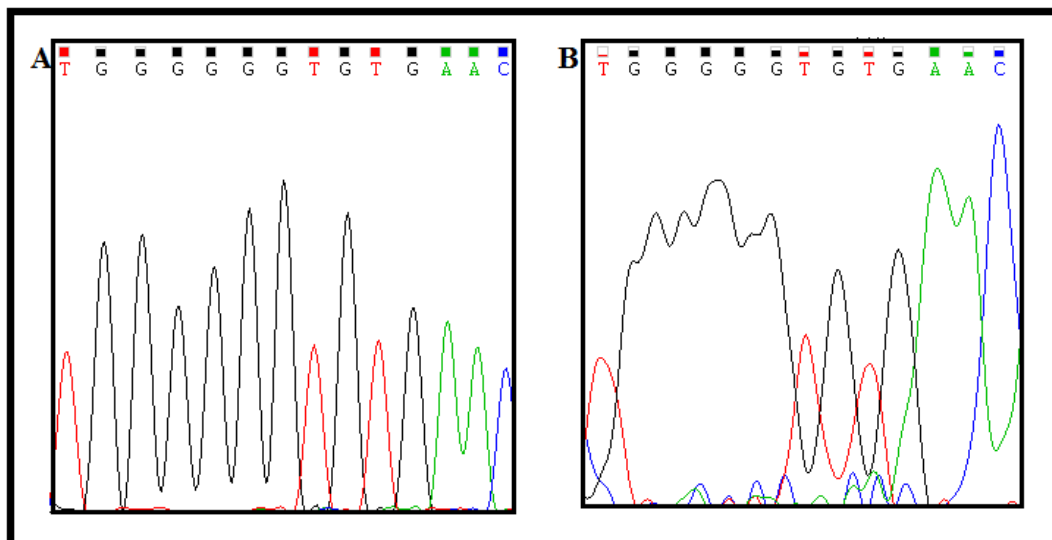


Fig. 12. Eletroforetogramas da sequência mutada com c.35delG em homozigotia. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem com 6 picos de Guaninas. B – Sequência do indivíduo PK2 com mutação c.35delG em heterozigotia, com 5 picos de Guaninas.

O indivíduo PK2 apresenta tal como o indivíduo anterior, pertencente à sua família, a mutação c.35delG. Todavia, esta está em homozigotia ou seja, presente em ambos os alelos, pelo que, os picos do eletroforetograma não se sobrepõem.

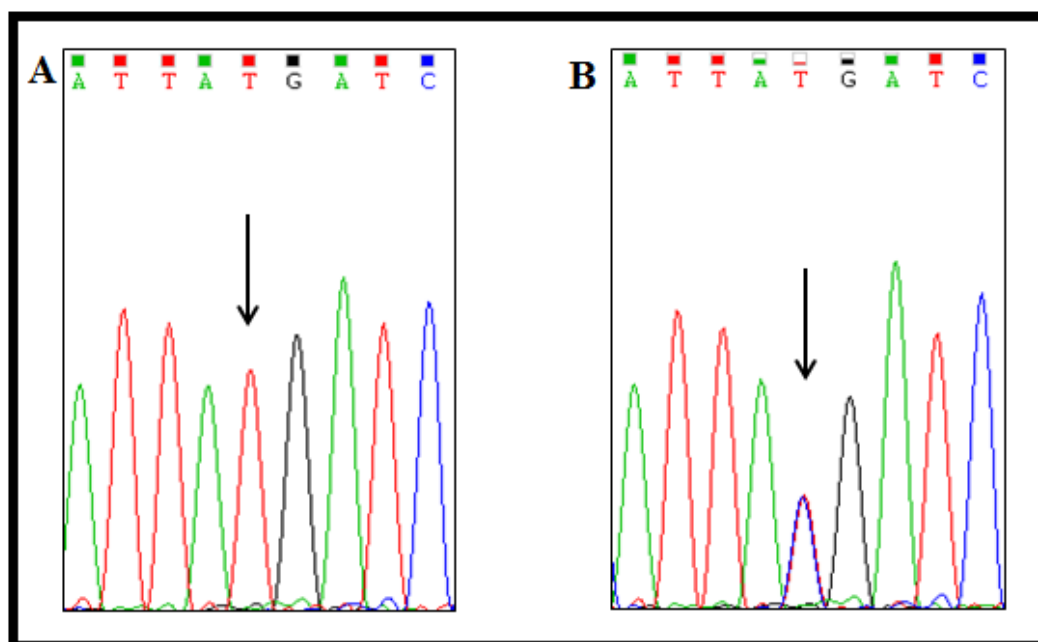


Fig. 13. Eletroforetograma da sequência mutada com Met34Thr. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem com um pico de Timina (pico vermelho indicado pela seta). B – Sequência do indivíduo PL1 com mutação Met34Thr em heterozigotia com um pico de Citosina sobreposto a um pico de Timina (picos azul e vermelho indicados pela seta).

O indivíduo PL1 apresenta a mutação Met34Thr. No eletroforetograma observa-se a sobreposição de dois picos, um T e um A, o que nos indica que a mutação está em heterozigotia.

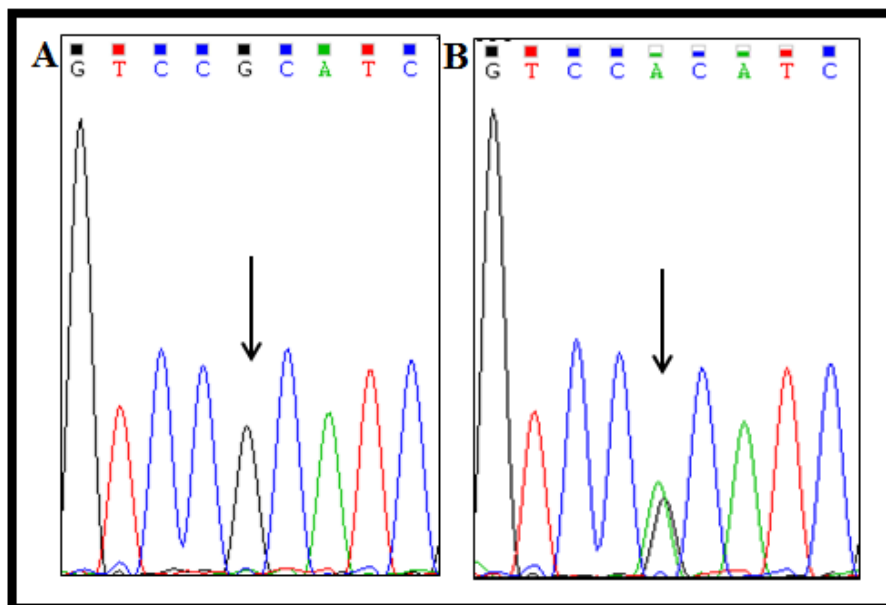


Fig. 14. Eletroforetograma da sequência mutada com R127H. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem (pico preto de guanina indicado pela seta). B – Sequência do indivíduo PM1 com mutação R127H em heterozigotia (dois picos sobrepostos de uma guanina a preto e uma adenina a verde indicados pela seta).

O indivíduo PM1 apresenta a mutação R127H em heterozigotia, uma vez que no eletroforetograma conseguimos observar a sobreposição de um pico de A com um G, comparativamente à sequência selvagem. O primeiro eletroforetograma (A) apenas apresenta um pico de G.

1.2. Análise do gene *GJB6*

Paralelamente à análise do gene *GJB2*, fez-se a análise do gene da Cx30. Contrariamente ao gene anterior, os resultados obtidos para o *GJB6* foram analisados diretamente no gel da eletroforese. Para além destes indivíduos, representados na fig. 15, todos os outros testados não apresentaram quaisquer deleções no gene.

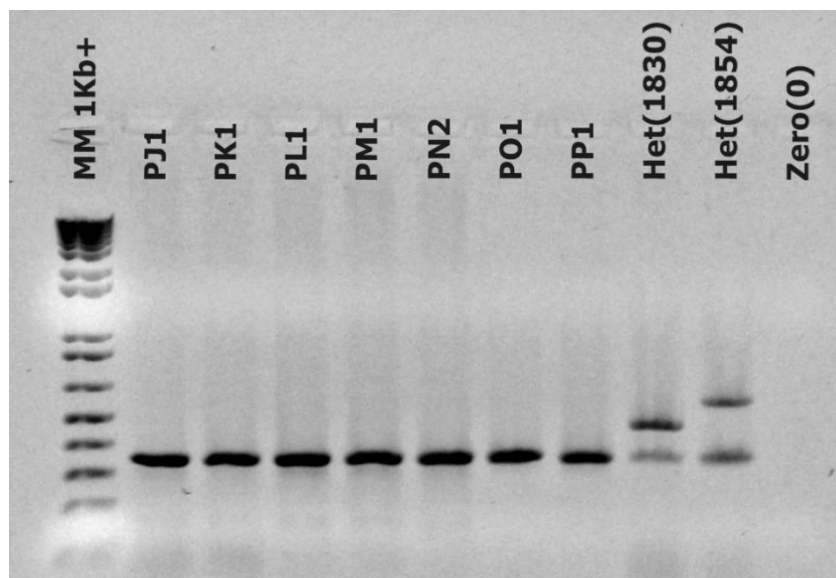


Fig. 15. Eletroforese em gel de agarose para análise das amostras PJ1, PK1, PL1, PM1, PN2, PO1, PP1, estudadas para *GJB6*. No primeiro poço está o marcador 1Kb Plus (Invitrogen), nos poços de 2-8 estão as amostras. No poço 9 e 10 estão respetivamente os indivíduos-controlo heterozigóticos para a del(*GJB6*-D13S1830) e para a del(*GJB6*-D13S1854). No poço 11 está o controlo negativo de PCR.

2. População Aleatória – Análise do gene *GJB2* e *GJB6*

Analisaram-se ainda, amostras provenientes de várias regiões de Portugal Continental e das ilhas para os dois genes em causa.

2.1. Análise do gene *GJB2*

Relativamente ao gene *GJB2*, foram sequenciadas 56 amostras aleatórias provenientes apenas da região do Açores, pois as outras amostras já tinham sido estudadas para este gene. Através da sequenciação do exão 2 do gene *GJB2* foram identificadas algumas variantes, representadas nas figuras seguintes.

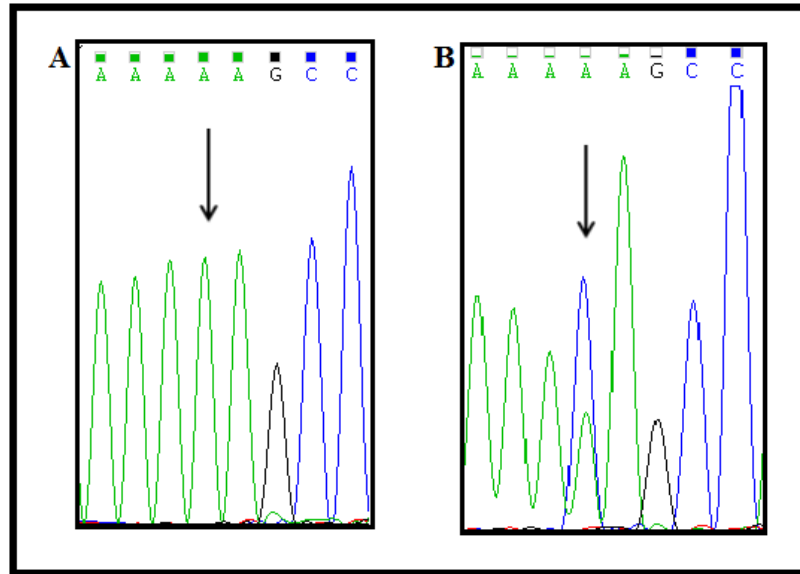


Fig. 16. Eletroforetograma da sequência mutada com mutação K224Q. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem (pico verde de adenina indicado pela seta). B – Sequência do indivíduo AAC34 com mutação K224Q em heterozigotia (dois picos sobrepostos de uma adenina a verde e uma citosina a azul indicados pela seta).

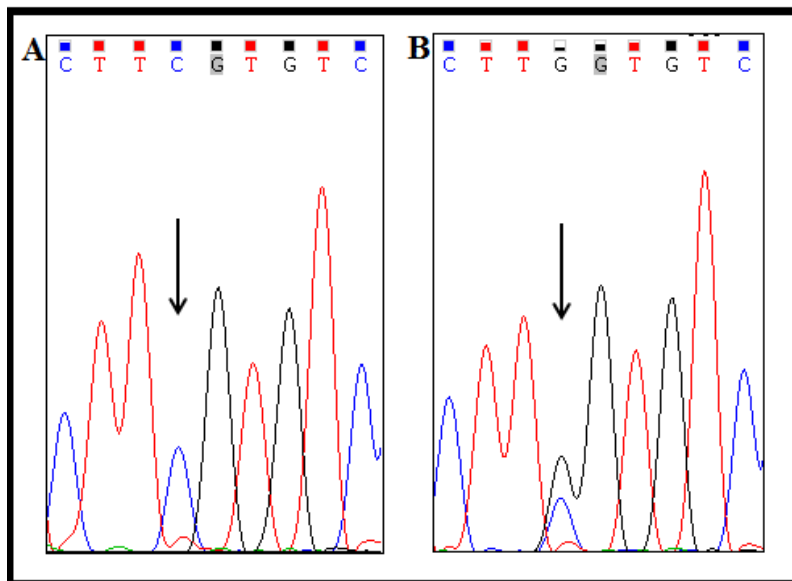


Fig. 17. Eletroforetogramas da sequência alterada com polimorfismo F83L. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem (pico azul de citosina indicado pela seta). B – Sequência do indivíduo AAC51 com polimorfismo F83L em heterozigotia (dois picos sobrepostos de uma guanina a preto e uma citosina a azul indicados pela seta).

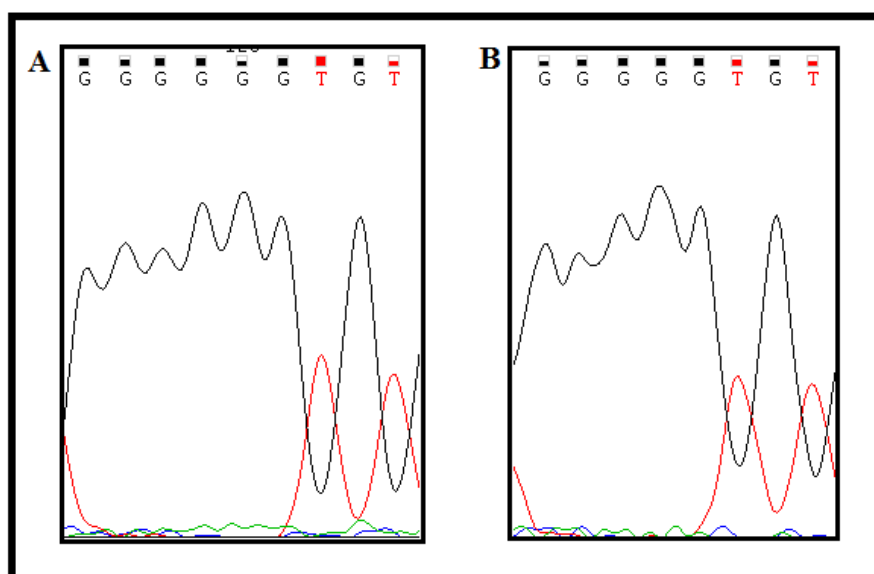


Fig. 18. Eletroforetograma da sequência com a mutação c.35delG. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem (6 picos pretos de guanina indicado). B – Sequência do indivíduo AAC99 com mutação c.35delG em heterozigotia (apenas com 5 picos pretos de guanina).

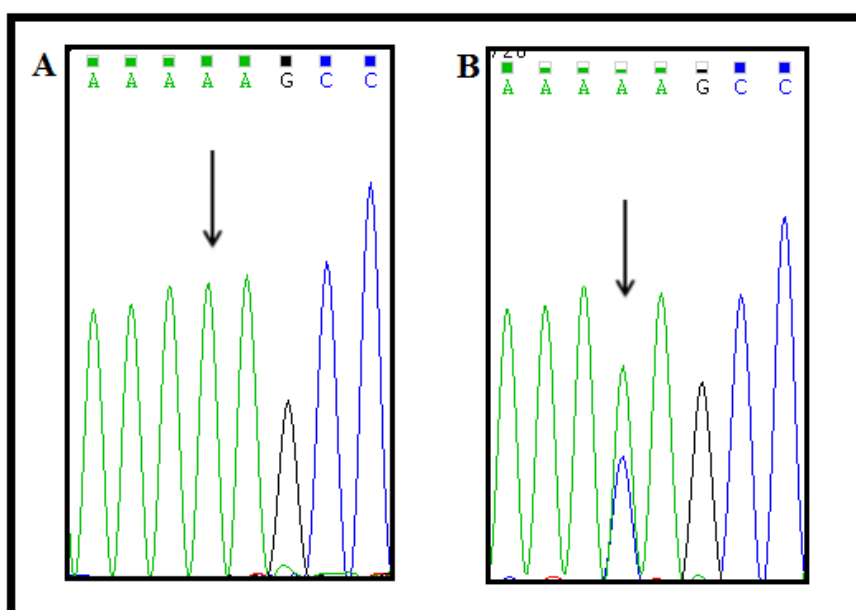


Fig. 19. Eletroforetograma da sequência mutada com mutação K224Q. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem (pico verde de adenina indicado pela seta). B – Sequência do indivíduo AAC103 com mutação K224Q em heterozigotia (dois picos sobrepostos de uma adenina a verde e uma citosina a azul indicados pela seta).

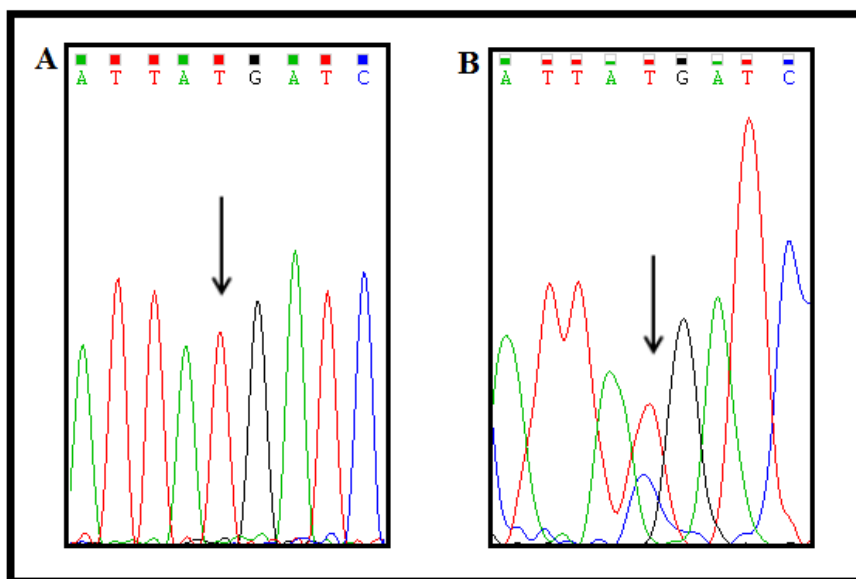


Fig. 20. Eletroforetograma da sequência mutada com mutação Met34Thr. A – Eletroforetograma de um indivíduo controle com sequência selvagem (pico vermelho de timina indicado pela seta). B – Sequência do indivíduo AAC110 com mutação Met34Thr em heterozigotia (dois picos sobrepostos de uma timina a vermelho e uma citosina a azul indicados pela seta).

2.2. Análise do gene *GJB6*

Na sequência da análise anterior, foi realizada a análise para o gene *GJB6*, mas agora para as 402 amostras provenientes de várias regiões. De todos os indivíduos testados, em nenhum foi encontrado, nem a deleção *del(GJB6-D13S1830)*, nem a *del(GJB6-D13S1854)*. Assim, todos os resultados foram negativos e um exemplo do gel onde é feita a análise pode ser observado na fig. 21.

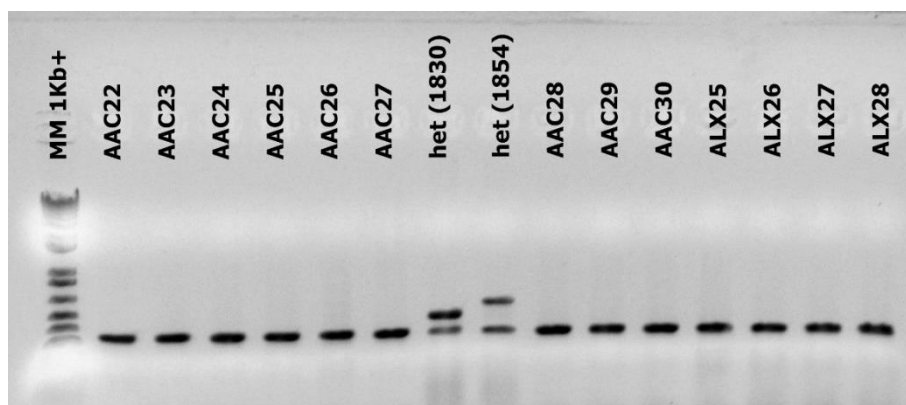


Fig. 21. Eletroforese em gel de agarose para análise da população aleatória das regiões dos Açores (AAC) e de Lisboa (ALX), estudadas para *GJB6*. No primeiro poço está o marcador 1Kb Plus (Invitrogen), nos poços de 2-7 e do 10-16 estão as amostras. No poço 8 e 9 estão, respectivamente, os indivíduos controle heterozigóticos para a *del(GJB6-D13S1830)* e para a *del(GJB6-D13S1854)*.

3. Estudos Funcionais *in vitro*

Em estudos anteriores, foram encontradas pelo grupo da surdez, 3 mutações ainda não descritas ao nível da expressão da proteína. De modo a caracterizá-las, recorreu-se aos estudos funcionais das mesmas e da sequência selvagem inserida num plasmídeo pCMV6-XL5. As mutações estudadas foram a p.Gly160Cys, a p.Gly160Ser e a p.Leu213X.

Em primeiro lugar, transformou-se uma estirpe competentes de *E.coli* – GCL5 α – com o DNA selvagem. Após transformação em placa, obteve-se colónias transformadas representadas na Fig. 22.



Fig. 22. Bactérias GCL5 α transformadas com o vetor pCMV6-XL5 (Sequência selvagem da Cx26)

Seguidamente, transformaram-se outras bactérias (bactérias competentes NZYStar®) com o DNA das 3 mutações acima mencionadas, obtendo-se as colónias em placas, representadas na Fig. 23.

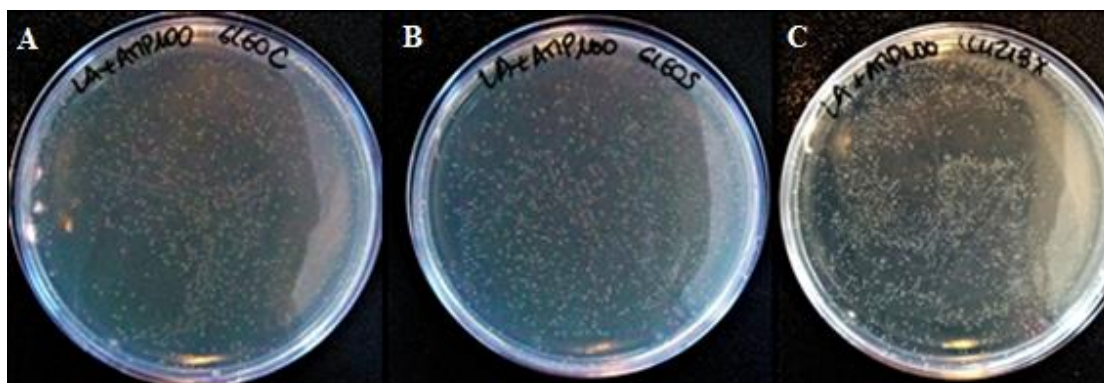


Fig. 23. Bactérias NZYStar® transformadas com as três mutações. A – Bactérias transformadas com a mutação p.Gly160Cys (A), p.Gly160Ser (B) e com p.Leu213X (C).

Juntamente com a transformação das bactérias com DNA com as mutações foram feitos quatro controlos. Fez-se um controlo apenas com meio LA, sem qualquer antibiótico, no qual se espalhou em placa, as bactérias NZYStar®, sem DNA (Fig. 24.). Este controlo é um controlo de viabilidade celular. Fez-se ainda um outro controlo, com meio LA e Ampicilina, ao qual se adicionou a mesma estirpe de bactérias *E.coli* não transformadas, ou seja, sem qualquer DNA (Fig. 24.) Este controlo LA+AMP

mostra que, só na presença de um gene de resistência à ampicilina poderiam crescer colónias e que na sua ausência (como é o caso), nada cresceria.

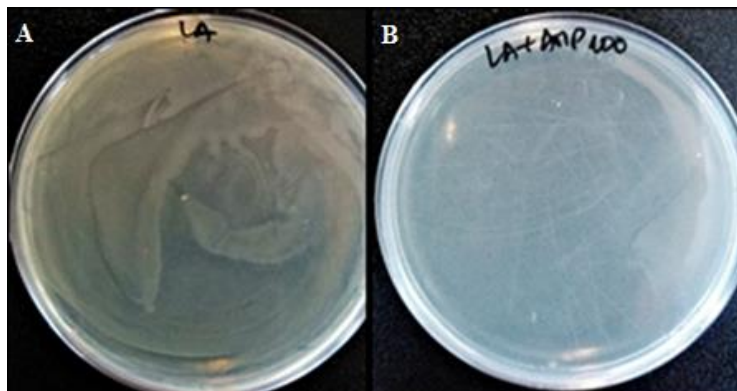


Fig. 24. Controlos da transformação de bactérias NZYStar®. A – Controlo de viabilidade celular com crescimento das bactérias sem DNA em meio LA, sem antibiótico. B – Controlo de ausência de crescimento de bactérias sem DNA em meio LA+AMP.

Na transformação das bactérias NZYStar®, fez-se também um controlo que permitiria quantificar a eficiência da mutagénese dirigida, através da introdução de um plasmídeo fornecido pelo Kit da NZYmutagenesis® (NZYTech). Às placas, adicionou-se meio LA com Ampicilina, Tetraciclina, X-gal e IPTG. Este controlo garante o sucesso das condições a que foram submetidas as amostras de DNA durante o PCR da mutagénese dirigida, caso as colónias fiquem de cor azul, devido à presença do X-gal e do IPTG no meio (Ver figura III.115 A).

Finalmente, fez-se ainda o controlo de transformação com o plasmídeo provido também pelo Kit NZYMutagenesis® (NZYTech). Este plasmídeo entra facilmente em bactérias competentes, indicando que, caso não existam colónias crescidas em placa, o problema da ausência de transformantes seria do DNA incorporado e não do estado de competência das bactérias. Desta forma, considera-se este plasmídeo, um controlo positivo da transformação (Fig. 25 B).

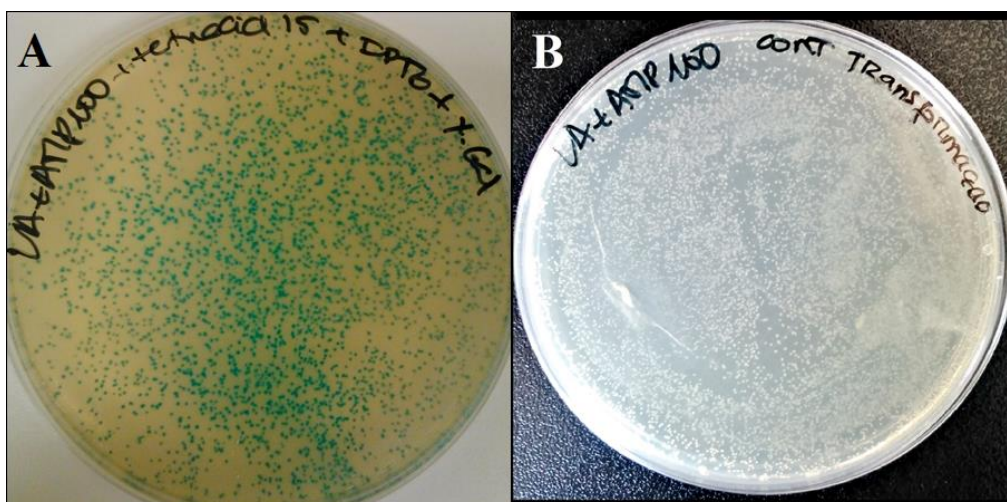


Fig. 25. Controle da mutagênese dirigida e controle da transformação. A – Controle da mutagênese com colônias azuis devido à presença do gene *lacZα* no plasmídeo e à presença de X-gal e IPTG no meio. B – Controle positivo da transformação devido à presença de um plasmídeo de controle.

Após transformação em placas, fez-se mini-preparações de ambas as sequências, quer da sequência selvagem, quer das três sequências mutadas. Sequenciou-se com o *primer* 2BR (Tabela 2), de modo a comprovarmos a sequência obtida. Para as sequências mutadas, a sequenciação confirmou a eficiência da mutagênese dirigida como pode ser observado nas Fig. 26., Fig. 27. e Fig. 28.

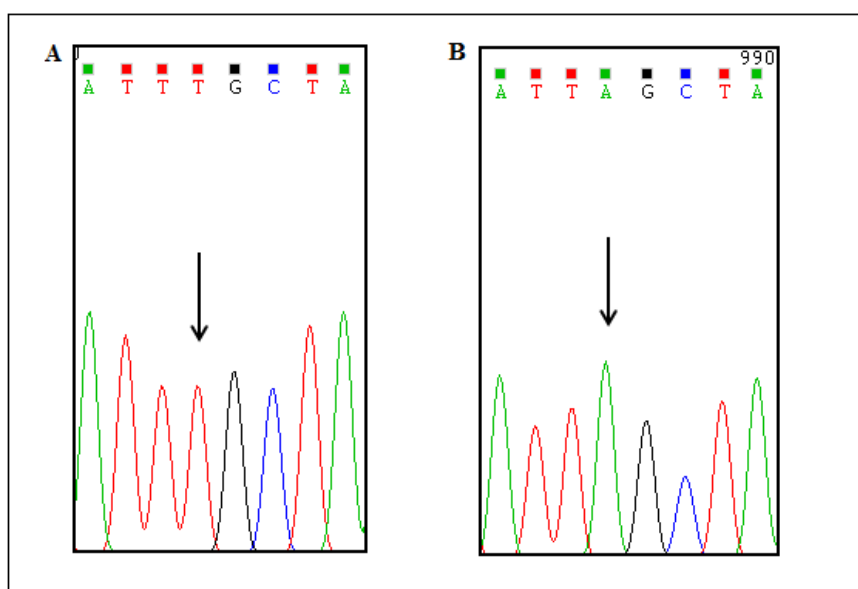


Fig. 26. Eletroforetograma da sequência mutada com p.Leu213X. A – Sequência selvagem da Cx26, com o nucleótido timina (pico vermelho indicado com uma seta). B – Representação da mutação p.Leu213X com o nucleótido alterado para uma adenina (pico verde indicado com uma seta).

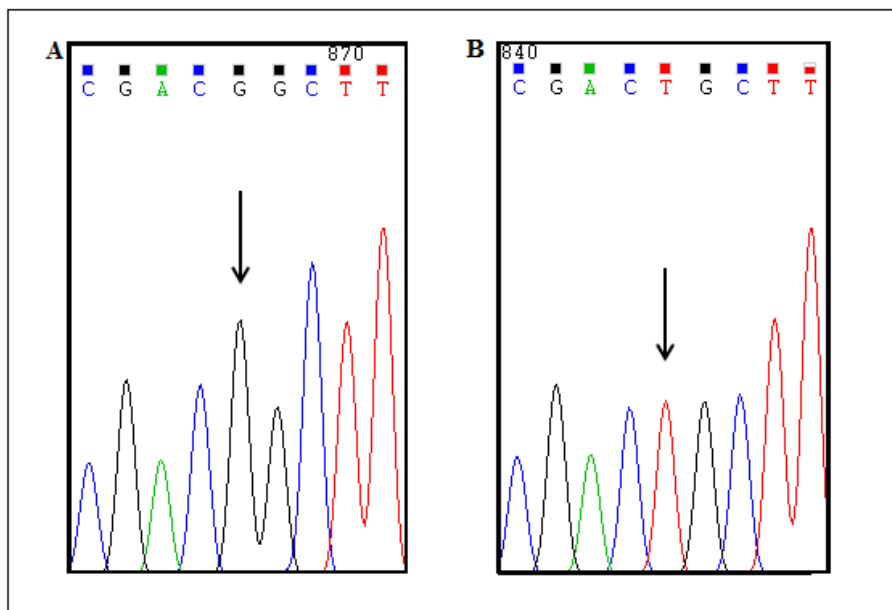


Fig. 27. Eletroforetograma da sequência mutada com p.Gly160Cys. A – Sequência selvagem da Cx26, com o nucleótido guanina (pico preto). B – Representação da mutação p.Gly160Cys com o nucleótido alterado para uma timina (pico vermelho).

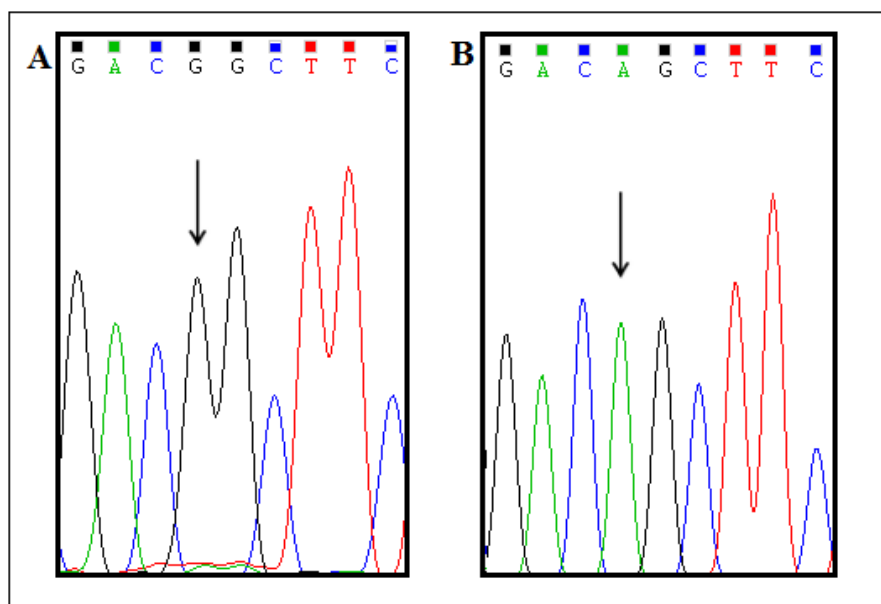


Fig. 28. Eletroforetograma da sequência mutada com p.Gly160Ser. A – Sequência selvagem da Cx26, com o nucleótido guanina (pico preto). B – Representação da mutação p.Gly160Ser com o nucleótido alterado para uma adenina (pico verde).

As HeLa foram as células escolhidas para o processo de transfeção celular, visto não expressarem de forma endógena a Cx26. Fez-se um *Western Blot*, de modo a quantificarmos as proteínas

mutadas com p.Leu213X, p.,Gly160Ser e p.Gly160Cys. Contudo, como os resultados esperados não foram obtidos, não foi possível quantificar os níveis de expressão da conexina mutada com as três mutações relativamente aos níveis de expressão da conexina selvagem nas células (Fig. 29/ Fig. 30).

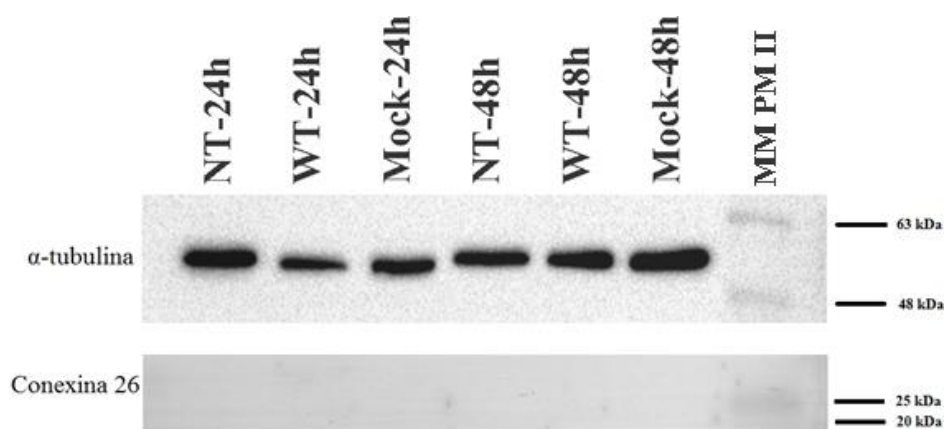


Fig. 29. Análise de Western Blot da expressão das proteínas. NT – Células não transfectadas com DNA. WT – Células transfectadas com a sequência selvagem (*Wild type*). Mock – Células transfectadas com DNA controlo do plasmídeo pUC18. Último poço com marcador Protein Marker II® NZYTech.

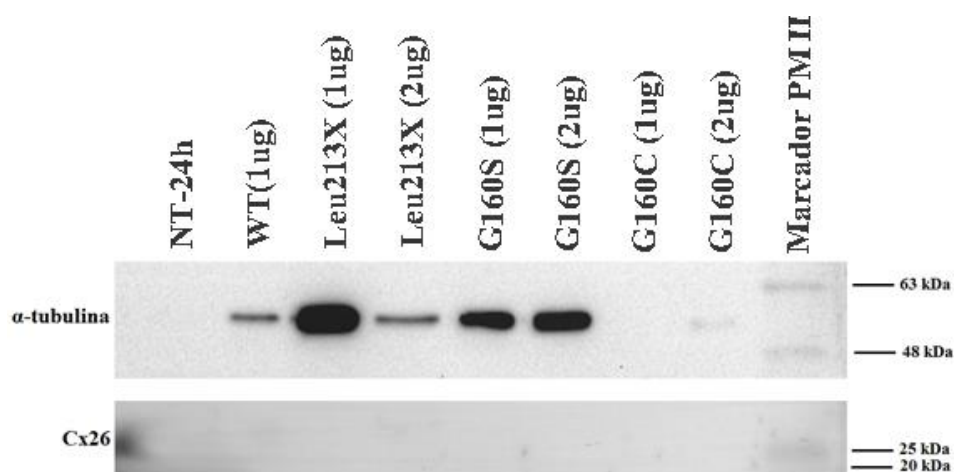


Fig. 30. Análise de Western Blot da expressão das proteínas. NT – Células não transfectadas com DNA após 24h de incubação. WT – Células transfectadas com 1 µg de DNA selvagem (*Wild type*). Restantes poços com células transfectadas com 1 µg e 2 µg de DNA mutado para as mutações Leu213X, Gly160Ser e Gly160Cys. Último poço com marcador Protein Marker II® NZYTech.

Para além do *Western Blot*, através de microscopia confocal de fluorescência localizou-se a proteína nas células e os resultados obtidos podem ser observados na fig. 31. A marcação da Cx26 está representada a verde, enquanto que a actina filamentosa está representada a vermelho. Relativamente à primeira linha da tabela, podemos observar que a Cx26 selvagem se encontra essencialmente na membrana e junto do núcleo. A Cx26 mutada com Leu213X localiza-se apenas sobreposta com a marcação do citoesqueleto e as células que expressam a Cx26 mutada com Gly160Cys e Gly160Ser

apresentam uma marcação semelhante às células que expressam a proteína selvagem, isto é, apresentam marcação em redor da célula e perto do núcleo.

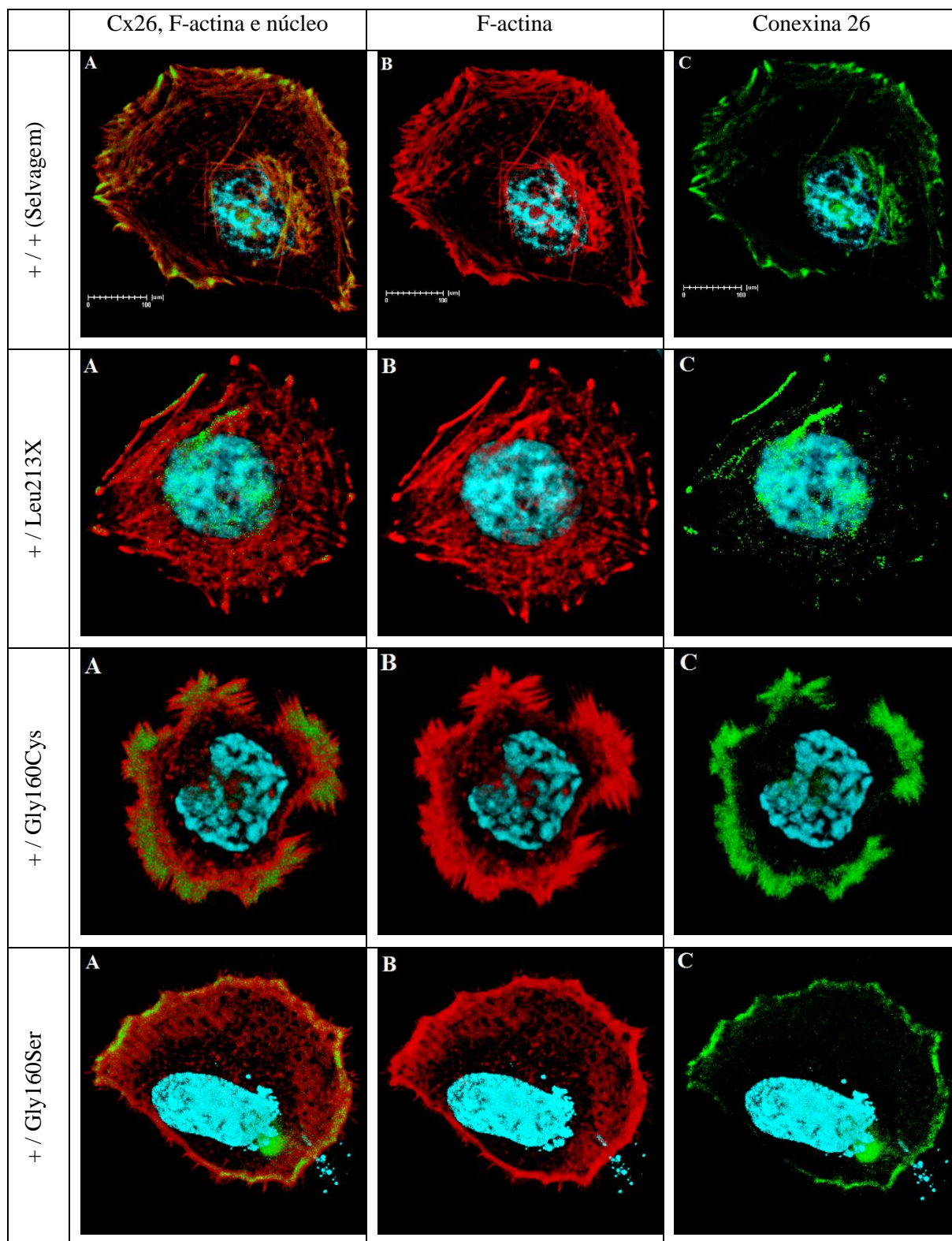


Fig. 31. Localização celular da Cx26 selvagem e mutantes para as mutações p.Gly160Ser, p.Gly160Cys e p.Leu213X em células HeLa. Imagens de microscopia confocal. A vermelho está representado o citoesqueleto de actina filamentosa (F-actina), a verde a conexina 26 e a azul o núcleo.

IV. DISCUSSÃO

1. Análise das famílias

Foram testadas 28 amostras de sangue provenientes de tubos de recolha com EDTA. Todas estas amostras pertenciam a famílias com historial de surdez, nas quais foram previamente estabelecidas o tipo e o grau de surdez que apresentavam, através de testes audiológicos. Para além deste diagnóstico, recorreu-se à análise genética com o intuito de identificar a etiologia genética e conhecer que mutações estariam associadas a cada um dos indivíduos, assim como o modo de transmissão hereditária que apresentavam. Dos 28 indivíduos testados, foram encontradas 3 mutações diferentes no gene *GJB2* – a c.35delG, a p.Met34Thr e a p.R127H, tal como observado na tabela 7. Relativamente ao gene *GJB6*, não foi encontrado nenhum indivíduo positivo para as deleções em estudo.

É importante salientar, que mesmo na ausência de um resultado positivo para os restantes indivíduos relativamente a estes genes estudados (*GJB2* e *GJB6*), não significa que seja excluída uma causa genética para a etiologia da surdez. A análise de outros genes implicados na surdez poderão ser alvo de mutações dando origem à perda auditiva.

Tabela 7. Resumo dos indivíduos das várias famílias sequenciadas com os respectivos genótipos e fenótipos.

(+/-): Indivíduo com sequência selvagem nos dois alelos. Exemplo (+/35delG): Indivíduo heterozigótico para a mutação c.35delG. Exemplo (35delG/35delG): Indivíduo homozigótico para a mutação c.35delG. (-): sem dados.

Indivíduos	Região codificante do <i>GJB2</i>	<i>GJB6</i>	Fenótipo
PJ1	+/+	+/+	Surdo
PJ2	+/+	+/+	Surdo
PK1	+/-35delG	+/+	Surdo
PK2	35delG/35delG	+/+	Surdo
PL1	+/-Met34Thr	+/+	Surdo
PM1	+/-R127H	+/+	Surdo
PN1	-	+/+	Surdo
PN2	+/+	+/+	Surdo
PO1	+/+	+/+	Surdo
PP1	+/+	+/+	Surdo
D1	+/+	+/+	Surdo
D4	+/+	+/+	Surdo
M1	+/+	+/+	Surdo
M6	+/+	+/+	Surdo
M8	+/+	+/+	Ouvinte
Q1	-	+/+	Surdo
Q2	-	+/+	Surdo
Q4	+/-R127H	+/+	Surdo
R5	+/+	+/+	Surdo
T1	+/+	+/+	Surdo
U1	+/+	+/+	Surdo
U2	+/+	+/+	Surdo
Y2	+/+	+/+	Surdo
BX1	+/+	+/+	Surdo
BY2	+/+	+/+	Surdo
NZ1	+/+	+/+	Surdo
OG2	+/-35delG	+/+	Surdo
PQ1	-	+/+	Surdo

1.1 Família PK

Esta família é composta por um probando surdo (PK1) com 30 anos de idade que apresenta como genótipo para a região codificante do *GJB2* +/-35delG. Foi identificado ainda, um familiar do indivíduo PK1, a que foi atribuído o código PK2, com a mesma mutação, mas em homozigotia (35delG/35delG). Ambos os indivíduos são surdos.

A mutação c.35delG é caracterizada pela deleção de uma das seis guaninas seguidas, neste caso, da guanina do nucleótido 35. O local onde ocorre a mutação é considerado um *hot spot* para mutações (Gasparini *et al.*, 2000). A c.35delG resulta num *frameshift* e na terminação prematura da proteína no codão 13 (Van Laer *et al.*, 2001). Sabe-se que, tem um padrão de transmissão recessivo (Gasparini *et al.*, 2000).

PK1 é portador da mutação c.35delG. Esta é considerada uma das mais comuns na população caucasiana (Gasparini *et al.*, 2000). Apenas no indivíduo PK2 se pode explicar a etiologia da surdez, uma vez que é homozigótico para a mutação em causa. PK1 apresenta apenas um alelo patogénico, como tal, a etiologia não é conclusiva, podendo ainda existir outras mutações noutros genes associados à surdez que justifiquem o seu fenótipo.

1.2 Família PL

Relativamente à família PL, identificou-se a mutação p.Met34Thr no probando PL1. Este último apresenta o genótipo +/Met34Thr para a região codificante de *GJB2*. O indivíduo apresenta surdez unilateral, do tipo neurosensorial. PL1 tem primos surdos e a mãe tem lúpus, uma doença autoimune que pode levar à perda de audição.

A mutação Met34Thr é caracterizada por ser uma mutação *missense*, codificando para um aminoácido diferente, com a substituição de uma metionina por uma treonina na posição 34 da cadeia polipeptídica, no primeiro domínio transmembranar (Griffith *et al.*, 2000; Feldmann *et al.*, 2004).

Esta mutação foi uma das primeiras a ser associada à Cx26, porém é uma mutação que gera grande controvérsia. Primeiramente, a mutação p.Met34Thr foi descrita como autossómica dominante, uma vez que foram descritos casos de indivíduos heterozigóticos (Cx26/Met34Thr) surdos. Porém, foram encontrados outros casos de indivíduos ouvintes para o mesmo genótipo. A mutação p.Met34Thr também é considerada controversa na medida em que, quando em heterozigotia composta com outras mutações, como é o caso da c.35delG, pode gerar fenótipos de indivíduos com uma audição normal (Feldmann *et al.*, 2004). Segundo Skerrett *et al.*, indivíduos homozigóticos para a mutação p.Met34Thr (Met34Thr/Met34Thr) são surdos pois os canais homotípicos que formam, formados por conexinas mutadas com esta mutação, não apresentam quaisquer condutância quando aplicada uma corrente.

Quando a Cx26 selvagem é co-expressa com a p.Met34Thr ocorrem algumas alterações ao nível da condutância, ou seja, uma diminuição da mesma, caso os dois alelos estejam ambos a ser expressos ao mesmo nível. Quando o *ratio* Met34Thr/Cx26 aumenta, é observado um decréscimo maior da corrente, o que pode indicar um efeito dominante da p.Met34Thr sobre a proteína selvagem, justificando a controvérsia observada na literatura (Skerrett *et al.*, 2004).

Em algumas famílias podem surgir casos em que os dois alelos são expressos a níveis diferentes, dando origem a fenótipos dominantes em relação a outros, originando surdos e ouvintes com o mesmo genótipo. No entanto, só com dados de outros familiares se poderia estabelecer tal comparação fenotípica.

1.3 Família PM

Foi encontrada a mutação R127H (p.Arg127His) no indivíduo PM1 da família PM. Esta mutação encontrava-se em heterozigotia. O probando PM1 é surdo e apresenta surdez severa bilateral. Apesar de não terem sido analisadas mais nenhuma amostras provenientes desta família, sabe-se que os pais de PM1 são ouvintes. No entanto, o probando desta família resultou de um cruzamento entre primos afastados.

A mutação R127H é uma mutação presente no *loop* citoplasmático da Cx26 e é caracterizada por ser uma mutação *missense*. Ocorreu a substituição de uma guanina por uma adenina no nucleótido 380, originando uma histidina em vez de uma arginina (<http://davinci.crg.es/deafness/index.php>).

Para além de outras variantes, também a R127H é considerada por alguns autores, como uma variante cuja patogenicidade ainda é controversa (Matos *et al.*, 2010).

Segundo D'Andrea *et al.*, 2002 a mutação R127H segue um modo de transmissão recessiva, e quando co-expressa com a sequência selvagem, não há inibição da atividade funcional da Cx26, contrariamente à mutação descrita anteriormente.

No entanto, Roux *et al.*, 2004 mostra que a R127H não pode ser causa de surdez severa ou profunda ao relatar casos de indivíduos homozigóticos para a mutação, que são ouvintes. Além disso, este autor identificou indivíduos heterozigóticos compostos como ouvintes.

Neste caso particular do indivíduo PM1, pensa-se então, tratar-se de uma variante que, por si só, não pode ser considerado causa de surdez.

1.4 Família Q

Relativamente à família Q foi detetada a mutação R127H, presente no probando (Q4). A mutação foi encontrada em heterozigotia com a sequência selvagem da conexina (+/R127H). O indivíduo Q4 apresenta surdez bilateral. Os seus pais (Q1 e Q2) também são surdos, e os seus genótipos são selvagens (Ver Fig. 32). Tem ainda um irmão surdo, sem quaisquer informações, e um irmão ouvinte.

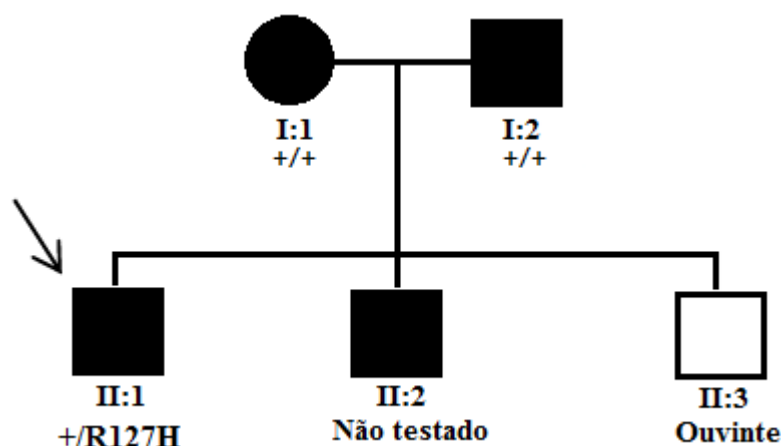


Fig. 32. Heredograma da família Q. O probando está indicado com a seta (Q4). O indivíduo apresenta a mutação R127H em heterozigotia com a sequência selvagem da conexina.

Esta mutação R127H foi identificada em 19,4% dos cromossomas de 54 indivíduos surdos de etnia cigana (Matos *et al.*, 2010). Os indivíduos da família Q pertencem também a esta mesma etnia.

Como descrito na família PM, a mutação R127H não parece ser de natureza patogénica segundo alguns autores. É descrita como uma variante e não pode ser considerada, por si só, a causa etiológica de surdez neste caso.

Relativamente às restantes famílias, não foram encontradas quaisquer mutações, quer no gene *GJB2*, quer no gene *GJB6*. A ausência de dados clínicos e de amostras dos respetivos familiares dos probandos das famílias não permitiu clarificar o tipo de surdez de todos os indivíduos representados na tabela 7.

A família PJ foi uma exceção. Apesar de não se ter identificado a etiologia da surdez neste caso familiar relativamente aos indivíduos estudados (PK1 e PK2), pensa-se que, podemos estar na presença de uma transmissão dominante da mutação, como se pode perceber pelo heredograma da fig. 33. Contudo, seriam necessárias amostras de outros membros da família PJ, para que fosse possível tirar esta conclusão.

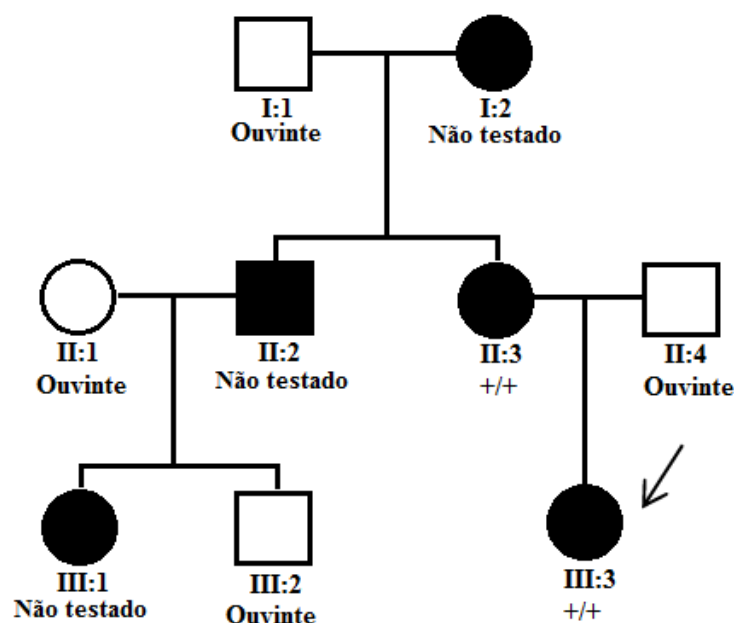


Fig. 33. Heredograma da família PJ. O probando está indicado com a seta (PJ1). O indivíduo apresenta um genótipo selvagem para ambos os alelos para a região codificante do *GJB2*. A sua mãe (PJ2) apresenta o mesmo genótipo que a filha.

2. Análise da população aleatória

Das 399 amostras dos recém-nascidos de Portugal, apenas 56 foram estudadas para o gene *GJB2*, uma vez que as restantes 343 já tinham sido alvo de estudo. Das 56 amostras, foram encontradas 5 mutações e polimorfismos, entre eles a K224Q, F83L, c.35delG, e a p.Met34Thr, como se pode observar na tabela 8. A frequência destas 5 variantes encontradas no total de 112 cromossomas foi de 4,46% na região dos Açores. Comparativamente com Portugal continental, esta percentagem foi menor, visto se ter estimado uma frequência alélica de 5,28% para as mutações encontradas no continente (Chora *et al.*, 2014).

Tabela 8. Frequência alélica das mutações encontradas na região codificante do gene *GJB2* nos Açores.

Mutações	Açores N=112 cromossomas	
	n	%
K224Q	2	1,79
F83L	1	0,89
35delG	1	0,89
Met34Thr	1	0,89
Total	5	4,46

2.1. K224Q

A alteração K224Q encontrava-se presente no indivíduo AAC34 e no indivíduo AAC103. Esta alteração é considerada um polimorfismo e é descrita através de uma alteração de uma A por uma C no nucleótido 670. Estudos relativos à sua patogenicidade, ainda não são claros, como tal, o fenótipo de ambos os indivíduos é desconhecido (Pandya *et al.*, 2003).

Este polimorfismo foi encontrado em amostras provenientes dos Açores com uma frequência alélica de 1,79%, não existindo dados sobre a presença desta variante noutras regiões e/ou distritos em Portugal. Pensa-se que, este facto está associado à história demográfica das ilhas (Chora *et al.*, 2014).

2.2 F83L

A amostra AAC51 apresentava o polimorfismo F83L. Esta variação da sequência da Cx26 ocorre no segundo domínio transmembranar, onde uma fenilalanina é alterada para uma leucina no aminoácido 83 (Scott *et al.*, 1998). Segundo Bruzzone *et al.*, 2003 o polimorfismo F83L não altera os níveis de expressão da proteína comparativamente à sequência selvagem e insere-se corretamente na membrana celular, formando um canal iónico estável. Os canais que formam apresentam ainda os mesmos níveis de condutância que a Cx26 não mutada. O polimorfismo F83L é considerado uma variante não-patogénica e foi encontrado na população dos Açores com uma frequência alélica de 0,89%, como mostra a tabela 8. No entanto, uma vez que a população é aleatória, não se conhece o fenótipo do indivíduo em estudo.

2.3 c.35delG e p.Met34Thr

As mutações c.35delG e p.Met34Thr foram encontradas, respetivamente, nos indivíduos AAC99 e AAC110. Em Portugal continental, a frequência da mutação c.35delG corresponde a 10,6% dos casos de surdez autossómica recessiva (Matos *et al.*, 2012). Relativamente aos Açores, a frequência alélica da mutação c.35delG é de 0,89%, exatamente como a frequência encontrada para a p.Met34Thr. Sabe-se que a c.35delG é a única mutação descrita como patogénica, ao passo que todas as outras encontradas apresentam uma natureza patogénica controversa.

Uma vez que todas estas mutações foram encontradas em heterozigotia, e que todas são consideradas recessivas, pensa-se que nenhum dos recém-nascidos aqui analisados manifestasse surdez, pelo menos, relativamente a este gene estudado.

3. Estudos funcionais

Numa primeira tentativa de transformação, utilizaram-se as bactérias XL1-Blue (Stratagene) mas a eficiência de transformação foi bastante baixa. Relativamente às três mutações, apenas se obteve

duas colónias correspondentes a apenas duas das três mutações. No entanto, através da sequenciação do DNA, observou-se que as sequências obtidas não se encontravam devidamente mutadas após mutagénese dirigida. Contudo, o controlo da mutagénese apresentou sempre elevada eficiência de transformação, confirmada a partir da presença de 99% de colónias azuis contabilizadas em placa.

Uma vez que só as mutações apresentavam baixa eficiência de transformação, repetiu-se a digestão com a enzima DpnI e incubou-se durante mais tempo, para garantir que todo o DNA parental tinha sido digerido. Ambas as tentativas não resultaram e continuou-se a não obter transformantes. Uma vez que a formação de estruturas secundárias podem inibir a reação da mutagénese dirigida, aumentou-se por último, a temperatura de emparelhamento para 68°C. No entanto, não obtivemos, uma vez mais, colónias em placa.

Para além do controlo da mutagénese, também os restantes controlos foram importantes. Nesta primeira tentativa de transformação, o controlo de viabilidade celular permitiu-nos perceber que o facto de não existirem transformantes foi devido ao estado de competência das bactérias e não foi à viabilidade celular das mesmas, pois elas cresceram normalmente num meio LA. Também o controlo LA+AMP foi imprescindível. Neste controlo, não foi adicionado DNA, o qual conferia às bactérias resistência ao antibiótico. Como tal, se se registasse crescimento, seria porque a ampicilina não estaria em boas condições.

O controlo da transformação permitiu-nos entender que o facto de não aparecerem colónias em placa após a transformação, não era devido ao estado de competência das bactérias. As bactérias estavam competentes, uma vez que foi utilizado um plasmídeo controlo provido pelo kit, que quando incorporado pelas mesmas bactérias, deu origem colónias em placas. O problema das transformações com o DNA mutado, com o QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), foi devido a erros do DNA durante a mutagénese DNA.

Assim, utilizou-se outro kit, o NZYmutagenesis kit® (NZYTech) de mutagénese dirigida nas condições iniciais, onde finalmente se obteve mais de 800 transformantes para as três mutações e uma eficiência de 100% para o controlo da mutagénese.

3.1 Quantificação da proteína

Western Blot é uma técnica muito utilizada para deteção de proteínas, permitindo a quantificação dos seus níveis de expressão. O nosso principal objetivo era identificar padrões de expressão que pudessem distinguir fenótipos normais de fenótipos mutantes. Pensou-se que as mutações Gly160Ser e Gly160Cys pudessem apresentar bandas mais fracas relativamente à sequência selvagem da Cx26. Tal hipótese surgiu do facto de se saber que a localização das mutações é num domínio importante no

docking da proteína (Dahl *et al.*, 1996). Assim, pensou-se que a estabilidade das proteínas poderia ser afetada, produzindo-se menores níveis de expressão face à sequência não mutada da Cx26. Relativamente à mutação Leu213X, pensou-se que os níveis de expressão fossem semelhantes aos da conexina selvagem, uma vez que o codão STOP originado se encontra na extremidade C-terminal da proteína.

Contudo, os resultados obtidos dificultam a obtenção de conclusões. No *western blot*, eram esperadas bandas que nos indicariam a presença de conexina 26. Estas bandas deveriam ser analisadas por densitometria de forma a serem demonstrados, estatística e significativamente, os diferentes níveis de expressão das proteínas mutadas relativamente a um controlo de proteína selvagem (Taylor *et al.*, 2013).

Para além de não se observar qualquer banda relativa à conexina, não se obteve também bandas da proteína controlo (α -tubulina). A α -tubulina é uma proteína *housekeeping*, como tal, todas as células deveriam expressá-la em condições fisiológicas normais. Dado que nem todos os poços apresentavam uma banda, chegou-se à conclusão de que as células não se encontravam viáveis (Taylor *et al.*, 2013). Pensa-se que o processo de transfeção não ocorreu como o esperado, e que as células existentes em cada poço não estivessem em igual número. Uma hipótese, é que ocorrido morte celular em alguns poços, diminuindo bastante ou mesmo inibindo os níveis de produção de α -tubulina, impossibilitando a sua quantificação.

3.2 Localização da Conexina 26

Através dos resultados obtidos com a técnica de imunofluorescência, observou-se que a maioria das células apresentava um sinal de fluorescência demasiado fraco, conseguindo-se apenas boa marcação para algumas das células transfetadas. Assim, é difícil poder-se determinar e assegurar com clareza, a localização exata da proteína mutada para as mutações em estudo em todas as células. O anticorpo primário utilizado para a deteção da Cx26 foi o anticorpo *policlonal goat* N-19 (Santa Cruz Biotechnology, INC). Este reconhece como epítipo aminoácidos pertencentes à extremidade N-terminal da conexina 26.

Na sequência selvagem, pode-se observar, expressão da proteína ao nível da membrana e em redor do núcleo, sobreposta com a marcação do citoesqueleto. Pensa-se assim, que a proteína selvagem estará a ser traduzida nos ribossomas junto do retículo endoplasmático (RE) e a ser transportada ao nível das vesículas de secreção do Golgi até à membrana, onde formam o canal.

Relativamente às mutações, pode-se observar através da fig. 21 que a conexina mutada com p.Leu213X acompanha, maioritariamente a marcação do citoesqueleto. No entanto, existe alguma marcação perto do núcleo, que poderá ser a proteína a ser traduzida. O codão STOP originado pela

mutação p.Leu213X parece causar dificuldades no *docking* da proteína, uma vez que ela não se encontra na membrana da célula, como se observa com a conexina selvagem.

Relativamente à mutação p.Gly160Ser, podemos observar maioritariamente a marcação da proteína na membrana plasmática e um aglomerado marcado junto do núcleo. Estes dados podem indicar que a proteína está a ser transportada através do citoesqueleto das células. As interações entre a conexina e os elementos do citoesqueleto são essenciais no transporte até à membrana (Dbouk et al., 2009).

A Cx26 mutada com a p.Gly160Cys parece migrar corretamente para a membrana (Fig. 21). Pensa-se que a alteração do nucleótido não afeta a inserção da proteína à membrana da célula onde era expressa. No entanto, os resultados podem, como referido anteriormente, não ser totalmente claros, uma vez que a marcação com anticorpo anti-Cx26 não se obteve como esperado. Para além do mais, o facto de não se ter conseguido encontrar duas células polarizadas a contactarem entre si, diminui a possibilidade de se entender se realmente o conjunto de seis conexinas se conseguiria inserir na membrana formando uma junção comunicante com a célula vizinha.

Uma vez que apenas 10% das células observadas na preparação de imunofluorescência apresentavam marcação da Cx26, a hipótese de hibridação inespecífica torna-se muito escassa. Caso estívéssemos perante uma hibridação inespecífica (ver fig. 21), a maioria das células teria esta marcação. Uma vez que isto não aconteceu, e dado que os resultados obtidos no *western blot*, foram negativos para a conexina, concluímos que apenas algumas células HeLa estavam a expressar a nossa proteína alvo. Os extratos obtidos nas amostras que migraram em gel no *western blot*, possivelmente levavam na sua maioria, células que não expressavam a conexina 26, promovendo a ausência de bandas durante a revelação.

4. Conclusões e perspetivas futuras

Os resultados obtidos relativamente à mutação p.Leu213X apontam para uma localização citoplasmática da Cx26 mutada, enquanto que as mutações p.Gly160Ser e p.Gly160Cys apontam para uma localização membranar da conexina. No entanto, a marcação do anticorpo é fraca, ao nível das três mutações estudadas e da sequência selvagem, não se podendo tirar conclusões.

Como tal, seria interessante, testar um outro anticorpo na deteção da Cx26. Foi utilizado antibiótico no meio de cultura, após transfeção celular, para eliminar células que não estavam a expressar a Cx26 (transfeção estável). No entanto, quando observadas ao microscópio, nem todas as células expressavam a nossa proteína em estudo, o que nos indica que o anticorpo não a detetou eficazmente.

Contudo, seria interessante ainda, avaliar as propriedades dos canais iônicos formados pelas proteínas mutadas que se conseguiram inserir na membrana, através de experiências utilizando a técnica de *patch clamp* e *dye transfer*. Esta técnica consiste na passagem de um fluxo iônico através da membrana celular entre células e na medição desse como corrente elétrica, obtendo-se assim, informação do canal com uma voltagem controlada.

Ainda nos estudos funcionais, faz parte do nosso objetivo futuro, estudar o papel dos *chaperones* farmacológicos no resgate da função da Cx26. Estes *chaperones* são pequenas moléculas existentes nas células e estão envolvidas na recuperação de defeitos a nível da conformação proteica. Elas podem estabilizar a conformação das proteínas mutantes, ajudar no tráfego celular e aumentar ainda, a viabilidade celular da proteína mutada (Leandro e Gomes, 2008)

No caso específico da conexina, e essencialmente na mutação p.Leu213X seria importante conseguir recuperar a função de canal. Pequenos agentes como o glicerol, DMSO e outros polióis atuam de forma estabelecer a conformação da proteína, aumentando também a taxa de rearranjo da estrutura proteica (Morello *et al.*, 2000).

Este princípio de ação dos *chaperones* farmacológicos tem sido utilizado com propósitos terapêuticos no combate a algumas doenças, como a doença de *Gaucher's*. Esta é uma doença causada devido a incapacidade, que um indivíduo doente, tem de metabolizar os lípidos, devido à produção deficiente da enzima beta-galactosidase. Contudo, aspetos como a dosagem, toxicidade, passagem da barreira hemato-encefálica e entrega a certos tipos de células ou compartimentos ainda são um problema, nesta área (Leandro e Gomes, 2008). Estes estudos têm tido bastante impacto na descoberta de novos alvos terapêuticos e na criação de fármacos candidatos no tratamento de outras doenças conformacionais, como o caso da perda de audição, pelo que abrem importantes perspectivas no tratamento da surdez.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B. et al. 2008. Proteins. In Molecular biology of the cell, 5^a ed., Garland Science, New York and London.

Almeida, S. et al. 2010. Infecção congénita por *Citomegalovirus*. Prevalência numa população da Beira Interior. Acta Pediátrica Portuguesa. 41 (4): 162-165.

Amaral, M. D e Farinha, C. M. 2013. Rescuing mutant CFTR: A multi task approach to a better outcome in treating cystic fibrosis. Current Pharmaceutical Design. 19.

Ambrosi, C. et al. 2013. Analysis of trafficking, stability and function of human connexin 26 gap junction channels with deafness-causing mutations in the fourth transmembrane helix. PLoS One 8(8): e70916.

Batissoco, A. C. et al. 2009. Prevalence of *GJB2* (Connexin-26) and *GJB6* (Connexin-30) mutations in a cohort of 300 Brazilian hearing-impaired individuals: implications for diagnosis and genetic counseling. Ear & Hearing 30 (1):1-7.

Bodmer, D. 2008. Protection, regeneration and replacement of hair cells in the cochlea: implications for the future treatment of sensorineural hearing loss. Swiss Medical Weekly. 138: 708-712.

Brobby, G. W., Muller-Myhsok, B. e Horstmann, R. D. 1998. Connexin 26 R143W mutation associated with recessive nonsyndromic sensorineural deafness in Africa. The New England Journal of Medicine. 338 (8): 548-550.

Bruzzone, R. et al. 2003. Loss-of-function and residual channel activity of connexin26 mutations associated with non-syndromic deafness. FEBS Letters. 533: 79-88.

Chora, J. R., Caria, H., Fialho, G. 2014. Diversidade genética da população açoriana: espectro e prevalência de mutações associadas a surdez. In: II congresso de ciência e desenvolvimento dos Açores. Açores.

Chung, C. T., Niemela, S. L. e Miller, R. H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proceedings of the national academy of sciences. 86. 2172-2175.

Crispino, G. et al. 2011. BAAV Mediated *GJB2* gene transfer restores gap junctions coupling in cochlear organotypic cultures from deaf Cx26Sox10Cre Mice. PLoS ONE 6 (8), e23289.

Cryns, K. et al. 2004. A genotype-phenotype correlation for *GJB2* (connexin 26) deafness. *Journal of Medical Genetics*.41: 147-154.

D'Andrea, P. et al. 2002. Hearing loss: frequency and functional studies of the most common connexin26 alleles. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296: 685-691.

Dahl, E. et al. 1996. Molecular cloning and functional expression of mouse connexin-30, a gap junction gene highly expressed in adult brain and skin. *The journal of Biological Chemistry* 271(30):17903-17910.

Dbouk, H. A. et al. 2009. Connexins: a myriad of functions extending beyond assembly of gap junction channels. *BioMed central*. 7(4).

del Castillo, F. J. et al. 2005. A novel deletion involving the connexin-30 gene, del(*GJB6*-D13S1854), found in trans with mutation in the *GJB2* gene (connexin-26) in subjects with DFNB1 non-syndromic hearing impairment. *Journal of Medical Genetics* 42:588-594.

Dinh, E. H. et al. 2010. Diverse deafness mechanisms of connexin mutations revealed by studies using in vitro approaches and mouse models. *Brain Research Journal*. 24. 1277: 52-69.

Dobson, C. M. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*. 426: 884-890.

Falah, M. et al. 2012. The anticipation and inheritance pattern of c.487A>G mutation in the *GJB2* gene. *Archives of Iranian Medicine* 15 (1): 49-51.

Feldmann, D. et al. 2004. Clinical evidence of the nonpathogenic nature of the M34T variant in the connexin 26 gene. *European journal of human genetics*. 12: 279-284.

Gasparini, P. et al. 2000. High carrier frequency of the 35delG deafness mutation in European populations. *European Journal of Human Genetics*. 8: 19-23

Gonçalves, A. C. et al. 2013. A novel p.Leu213X mutation in *GJB2* gene in a Portuguese family. *International journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 77:89-91.

Grifa, A. et al. 1999. Mutations in *GJB6* cause nonsyndromic autosomal dominant deafness at DFNA3 locus. *Nature Genetics*. 23: 16-18.

Griffith, A. J. et al. 2000. Autosomal recessive nonsyndromic neurosensory deafness at DFNB1 not associated with the compound-heterozygous *GJB2* (connexin 26) genotype M34T/167delT. *American Journal of Human Genetics*. 67: 745-749.

Hartl, U. F. e Hayer-Hartl, M. 2009. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Structural and Molecular Biology*. 16. 6: 574-581.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kalmatsky, B. D. et al. 2012. Structural studies of N-terminal mutants of connexin 32 using ^1H NMR spectroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 526: 1-8.
- Kelsell, D. P., Di, W. e Houseman, M. J. 2001. Connexin mutations in skin disease and hearing loss.. *The American Journal of Human Genetics*. 68: 559-568.
- Kochhar, A., Hildebrand, M. S., e Smith, R. J. H. 2007. Clinical aspects of hereditary hearing loss. *Genetics in Medicine*. 9 (7): 393-408.
- Lara, M. A. C. et al. 2012. Detecção de polimorfismos no exon14 do gene CAPN1 em raças bovinas europeias, zebuínas e seus mestiços. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 2: 197-202.
- Leandro, P. e Gomes, M. 2008. Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini-Reviews in Medical Chemistry*. 8(9): 901-911.
- Machado-Santelli, G. M. e Ionta, M. 2012. Gap junction intercellular communication and connexin expression profile in normal liver cells and hepatocarcinoma. In *Hepatocellular carcinoma – basic research*. InTech. 275-286.
- Mani, R. S. et al. 2009. Functional consequences of novel connexin26 mutations associated with hereditary hearing loss. *European Journal of Human Genetics*. 17: 502-509.
- Martínez, A. D. et al. 2009. Gap-junction channels dysfunction in deafness and hearing loss. *Antioxidants & redox signaling* 11 (2): 309-322.
- Marziano, K. N. et al. 2003. Mutations in the gene for connexin 26 (*GJB2*) that cause hearing loss have a dominant negative effect on connexin 30. *Human Molecular Genetics* 12 (8): 805-812.
- Massimiliano, B. et al. 2006. Pathogenic role of the deafness-related M34T mutation of Cx26. *Human Molecular Genetics*. 15 (17): 2569- 2587.
- Matos, T. D. et al. 2007. A novel hearing loss-related mutation occurring in the *GJB2* basal promoter. *Journal of Medical Genetics* 44: 721-725.
- Matos, T. D. et al. 2010. The controversial p.Arg127His mutation in *GJB2*: Report on three Portuguese hearing loss family cases. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 14(1): 141-144.
- Matos, T. D. 2012. Contribution of the *GJB2* gene to nonsyndromic sensorineural hearing loss in the Portuguese population. PhD Thesis.
- Mese, G., Richard, G. e White, T. W. 2007. Gap Junctions: Basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*. 127: 2516-2524.

Minami, S. B. et al. 2012. Comorbidity of *GJB2* and *WFS1* mutation in one family. *Gene*. 501: 193-197.

Minárik, G. et al. 2003. High frequency of *GJB2* mutation W24X among Slovak Romany (gypsy) patients with non-syndromic hearing loss (NSHL). *General Physiology and Biophysics* **22**: 549-556.

Morello, J. et al. 2000. Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends in Pharmacological Sciences*. 21:466-469.

Morton, C. C. e Nance, W. E. 2006. Current Concepts. Newborn Hearing screening – a silent revolution. *The New England Journal of Medicine*. 354: 2151-64.

Oh, S. et al. 1997. Changes in permeability caused by connexin 32 mutations underlie X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 19: 927-938.

Pandya, A. et al. 2003. Frequency and distribution of *GJB2* (connexin 26) and *GJB6* (connexin 30) mutation in a large North American repository of deaf probands. *Genetics in Medicine*. 5(4): 295-303.

Paul, V. P e Whitelaw, G. M. 2011. *Hearing and Deafness*. Jones and Bartlett publishers. Sudbury, Massachusetts.

Petit, C., Levilliers, J., e Hardelin, J. 2001. Molecular Genetics of hearing loss. *Annual Review of Genetics* 35:589-646.

Qu, C., Gardner, P., e Schrijver, I. 2009. The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by connexin 30. *Experimental Cell Research*. 315: 1683-1692.

Rabionet, R., Gasparini, P. e Estivill, X. 2000. Molecular genetics of hearing impairment due to mutations in gap junction genes encoding beta connexins. *Human Mutation*. 16: 190-202.

Rehm, H. L. et al. 2003. *Understanding the genetics of deafness. A guide for patients and families*. Harvard Medical School Center for Hereditary Deafness, Cambridge.

Riaz, A., e Iqbal, M. 2012. Non-syndromic autosomal recessive deafness in Pakistani population: epidemiology and genetics. *Pakistan Journal of Zoology* 44 (6):1431-1438.

Rodriguez-Paris, J. et al. 2011. Allele-specific impairment of *GJB2* expression by *GJB6* deletion del(*GJB6*-D13S1854). *PLoS ONE* 6 (6), e21665.

Roux, A. et al. 2004. Molecular epidemiology of DFNB1 deafness in France. *BMC medical genetics*. 5 (5).

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Scott, D. A. et al. 1998. Identification of mutations in the connexin 26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Human Mutation* 11: 387-394

Skerrett, I. M. et al. 2004. Aberrant gating, but a normal expression pattern, underlies the recessive phenotype of the deafness mutant connexin26 M34T. *The FASEB journal*. 18: 860-862.

Snoeckx, R. L. et al. 2005. *GJB2* mutations and degree of hearing loss: a multicenter study. *American Journal of Human Genetics* 77: 945-957.

Snoeckx, R. L. e Camp, G. V. 2007. Nonsyndromic hearing loss: cracking the cochlear code. *In* Genes, hearing, and deafness. (New Science Press), 1ª ed., 63-78, United Kingdom.

Tapan, C. K., e Subhankar, P. 2006. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *The FEBS Journal*. 273: 1331-1349.

Taylor, S. C. et al. 2013. A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *Molecular Biotechnology*. 55(3): 217-226.

Teubner, B. et al. 2003. Connexin30 (*GJB6*)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Human Molecular Genetics* 12(1): 13-21.

Van Laer, L. et al. 2001. A common founder for the 35delG *GJB2* gene mutation in connexin 26 hearing impairment. *Journal of medical genetics*. 38: 515-518.

Watson, J. D. et al. 1987. Molecular biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing company, Inc. Menlo Park. California.

Willems, P. J. 2000. Genetic causes of hearing loss. *The New England Journal of Medicine*. 342(15): 1101-1109.

Yum. W. S. et al. 2007. Human connexin26 and connexin30 form functional heteromeric and heterotopic channels. *American Journal of Physiology* 293:1032-1048.

Referências eletrônicas

Ballana, E., et al. Connexin and deafness homepage. URL: <http://davinci.crg.es/deafness/index.php>. Acedido em 15 de Julho de 2014.

World Health Organization. Deafness and Hearing Loss. Versão Fevereiro 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/> in World Health Organization, <http://www.who.int/en/>.

[http://www.prozomix.com/uploaded/PROMB01201%20\(NZYMutagenesis%20kit\).pdf](http://www.prozomix.com/uploaded/PROMB01201%20(NZYMutagenesis%20kit).pdf)

National center for Biotechnology information. Versão Acedido a 18 de Julho de 2014.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004004.3

ANEXOS

ANEXO A – Preparação de meios

Meio TSS

Quantidade/Volume	Componentes
1 g	PEG 8000
0,5 mL	DMSO
2,5 mL	MgCl ₂ 50mM
Perfazer com LB até 10 mL	

Meio NZY⁺

Quantidade/Volume	Componentes
10 g	Caseína hidrolisada
5 g	Extrato de levedura
5 g	NaCl
Adicionar dH ₂ O até perfazer o volume final (1000 mL)	
Ajustar o pH até 7,5 com NaOH	
Autoclavar	
Adicionar as seguintes soluções previamente filtradas	
12,5 mL	MgCl ₂ 1M
12,5 mL	MgSO ₄ 1M
10 mL	Glucose 2M

Tampão de amostra

Quantidade/Volume	Componentes
1,25 mL	Tampão de gel de concentração (Stacking)
3 mL	SDS 10%
1 mL	Glicerol 100%
0,2 mL	Azul de bromofenol 1%
4,55 mL	H ₂ O estéril
154 mg	DTT

Gel de separação 12,5%.

Gel de separação 12,5%	
Volume (mL)	Componentes
5,2	H ₂ O _d
4,5	Tampão de separação 1,5 M pH 8,8
7,5	Acrilamida
0,180	Glicerol 10%
0,180	SDS 10%
0,135	TEMED
0,010	PSA (persulfato de amónia)

Gel de concentração 4%

Gel de concentração 4%	
Volume	Componentes
7	H ₂ O _d
3	Tampão de concentração 0,5 M pH 6,8
1,6	Acrilamida
0,120	Glicerol 10%
0,120	SDS 10%
0,090	TEMED
0,010	PSA (persulfato de amónia)

ANEXO B – Protocolos

Extração de DNA a partir de sangue periférico com EDTA (JetQuick® Blood and Cell Culture Kit – GENOMED)

1. Homogeneizar as amostras de sangue através do vórtex.
2. Pipetar 200 µl de cada amostra para um microtubo de 1,5 mL.
3. Adicionar 20 µl de Proteinase K (20 mg/mL) ao microtubo e agitar.
4. Adicionar 10 µl de RNase A (20 mg/mL) ao microtubo e agitar.
5. Adicionar 220 µl de tampão K1 ao microtubo e agitar.
6. Incubar a 58°C durante 10 min.
7. Adicionar 200 µl de etanol absoluto e agitar por inversão.
8. Colocar as colunas providas do kit nos tubos coletores correspondentes.
9. Colocar o volume total da amostra na coluna. Centrifugar a 10.000 g durante 1 min. Descartar o filtrado.
10. Adicionar 500 µl de tampão KX à coluna. Centrifugar a 10.000 g durante 1 min. Descartar o filtrado.
11. Adicionar 500 µl de tampão K2 à coluna. Centrifugar a 10.000 g durante 1 min. Descartar o filtrado.
12. Centrifugar à velocidade máxima durante 1 min.
13. Colocar as colunas em novos microtubos de 1,5 mL.
14. Eluir o DNA em 100 µl de Tris-HCl (pH 8,5, a 10 mM) previamente pré-aquecido a 70°C, cobrindo o centro da coluna.
15. Incubar à temperatura ambiente durante 2 min.
16. Centrifugar a 10.000 g durante 2 min.
17. Marcar e guardar os microtubos com DNA a -20°C.

Purificação dos produtos de PCR (JetQuick® Spin Column PCR Purification Kit – GENOMED)

1. Colocar o volume total dos produtos de PCR em microtubos de 1,5 mL.
2. Adicionar 400 µl de tampão H1 e agitar por pipetagem.
3. Colocar as colunas micro-spin nos tubos coletores correspondentes e aplicar à mistura anterior.

4. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min.
5. Rejeitar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo coletor.
6. Adicionar 500µl de tampão H2 (reconstituído previamente com etanol).
7. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min.
8. Rejeitar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo coletor.
9. Centrifugar à velocidade máxima durante 1 min.
10. Rejeitar o filtrado e colocar a coluna num microtubo novo de 1,5 mL.
11. Aplicar 35µl de H₂O estéril pré-aquecida a 65°C diretamente no centro da membrana para eluir o DNA.
12. Deixar repousar 2 min.
13. Centrifugar a 12.000 rpm durante 2 min.
14. Marcar e guardar o produto purificado a -20°C e confirmar a sua pureza em gel.

Mini-Preparação do plasmídeo (NZYMiniprep® – NZYTech)

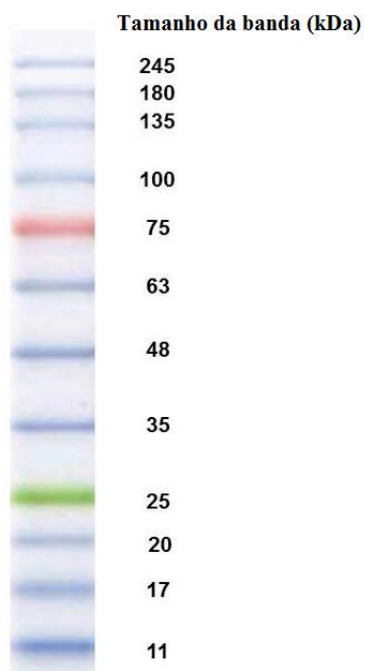
1. Utilizar o pellet de 1-5 mL da cultura celular de *E.coli* crescida em meio LB. Centrifugar a cultura a 11.000 g durante 30 seg. Descartar o sobrenadante, o melhor possível.
2. Ressuspender o pellet em 250 µL de tampão A1. Utilizar o vórtex vigorosamente.
3. Adicionar 250 µL de tampão A2 e agitar gentilmente por inversão dos microtubos, 6-8 vezes. Incubar à temperatura ambiente durante 4 min, no máximo. Não usar o vórtex.
4. Adicionar 300 µL do tampão A3. Agitar gentilmente por inversão dos microtubos, 6-8 vezes. Não usar o vórtex.
5. Centrifugar de 5-10 min a 11.000 g à temperatura ambiente, dependendo do volume do pellet inicial.
6. Colocar as colunas NZYTech nos tubos coletores e passar o sobrenadante da centrifugação anterior, do passo 5, no interior da coluna. Centrifugar durante 1 min, a 11.000 g. Descartar o sobrenadante do tubo coletor.
7. Adicionar 500 µL do tampão AY na coluna. Centrifugar durante 1 min, a 11.000 g. Descartar o sobrenadante do tubo coletor.
8. Adicionar 600 µL do tampão A4 (previamente reconstituído com etanol). Centrifugar durante 1 min, a 11.000 g. Descartar o sobrenadante do tubo coletor.
9. Voltar a colocar a coluna no tubo coletor e centrifugar durante mais 2 min, a 11.000 g.
10. Colocar a coluna num novo microtubo de 1,5 mL e adicionar 50 µL do tampão AE. Incubar durante 1 min, à temperatura ambiente. Centrifugar durante 1 min, a 11.000 g.

11. Caso pretenda obter uma maior concentração de DNA, adicione em vez dos 50 μL , apenas 30 μL do tampão AE (de forma a obter uma concentração 1.3 vezes mais concentrada). Guardar o DNA a -20°C .

Medi-Preparação do plasmídeo (NZYMidiprep® – NZYTech)

1. Utilizar o pellet de 25-30 mL da cultura celular de *E.coli* crescida em meio LB. Centrifugar a cultura a 6000 g durante 10 min, a 4°C . Descartar o sobrenadante, o melhor possível. Ressuspender o pellet em 4 mL de tampão M1. Utilizar o vórtex vigorosamente.
2. Adicionar 4 mL de tampão M2 e agitar gentilmente por inversão dos tubos, 5 vezes. Incubar à temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) durante 2-3 min, no máximo. Não usar o vórtex.
3. Adicionar 4 mL do tampão M3. Agitar gentilmente por inversão dos tubos, 10-15 vezes. Não usar o vórtex.
4. Equilibrar a coluna NZYTech com 2,5 mL de tampão MEQ. Deixar que o tampão passe a coluna pela ação da gravidade.
5. Centrifugar durante 30 min a ≥ 20.000 g, a 4°C . Se o sobrenadante contiver matéria em suspensão, voltar a centrifugar mais 15 min.
6. Colocar o sobrenadante nas colunas NZYTech e permitir que a coluna fique vazia pela ação da gravidade.
7. Lave a coluna NZYTech com 10 mL de tampão MW. Deixar atuar a ação da gravidade.
8. Eluir o DNA plasmídico com 5 mL do tampão ME. Deixar atuar a ação da gravidade. Passar o volume eluído para um novo tubo.
9. Adicionar 3,5 mL de isopropanol à temperatura ambiente para precipitar o DNA plasmídico eluído. Deixar repousar 2 min. Centrifugar a ≥ 15000 g durante 30 min, a 4°C . Descartar o sobrenadante cuidadosamente.
10. Adicionar 2 mL de etanol a 70%, à temperatura ambiente, ao pellet e centrifugar a ≥ 15000 g durante 5 min à temperatura ambiente. Cuidadosamente remover completamente o etanol com uma pipeta fina. Deixar secar os tubos.
11. Adicionar o volume apropriado d tampão TE ou água estéril. Guardar o DNA a -20°C .

ANEXO C – Marcador Protein Marker II®, NZYTech



ANEXO D – Resumo dos indivíduos

Tabela 1. Resumo dos indivíduos. Código dos indivíduos testados para o gene GJB6.

Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6
AAC1	+/+	AAC41	+/+	AAC81	+/+	ALX29	+/+
AAC2	+/+	AAC42	+/+	AAC82	+/+	ALX30	+/+
AAC3	+/+	AAC43	+/+	AAC83	+/+	ALX31	+/+
AAC4	+/+	AAC44	+/+	AAC84	+/+	ALX32	+/+
AAC5	+/+	AAC45	+/+	AAC85	+/+	ALX33	+/+
AAC6	+/+	AAC46	+/+	AAC86	+/+	ALX34	+/+
AAC7	+/+	AAC47	+/+	AAC87	+/+	ALX35	+/+
AAC8	+/+	AAC48	+/+	AAC88	+/+	ALX36	+/+
AAC9	+/+	AAC49	+/+	AAC89	+/+	ALX37	+/+
AAC10	+/+	AAC50	+/+	AAC90	+/+	ALX38	+/+
AAC11	+/+	AAC51	+/+	AAC91	+/+	ALX39	+/+
AAC12	+/+	AAC52	+/+	AAC92	+/+	ALX40	+/+
AAC13	+/+	AAC53	+/+	AAC93	+/+	ALX41	+/+
AAC14	+/+	AAC54	+/+	AAC94	+/+	ALX42	+/+
AAC15	+/+	AAC55	+/+	AAC95	+/+	ALX43	+/+
AAC16	+/+	AAC56	+/+	AAC96	+/+	ALX44	+/+
AAC17	+/+	AAC57	+/+	AAC97	+/+	ALX45	+/+
AAC18	+/+	AAC58	+/+	AAC98	+/+	ALX46	+/+
AAC19	+/+	AAC59	+/+	AAC99	+/+	ALX47	+/+
AAC20	+/+	AAC60	+/+	AAC100	+/+	ALX48	+/+
AAC21	+/+	AAC61	+/+	AAC101	+/+	ALX49	+/+
AAC22	+/+	AAC62	+/+	AAC102	+/+	ALX50	+/+
AAC23	+/+	AAC63	+/+	AAC103	+/+	ALX51	+/+
AAC24	+/+	AAC64	+/+	AAC104	+/+	ALX52	+/+
AAC25	+/+	AAC65	+/+	AAC105	+/+	ALX53	+/+
AAC26	+/+	AAC66	+/+	AAC106	+/+	ALX54	+/+
AAC27	+/+	AAC67	+/+	AAC107	+/+	AAL123	+/+
AAC28	+/+	AAC68	+/+	AAC108	+/+	AFA31	+/+
AAC29	+/+	AAC69	+/+	AAC109	+/+	AFA34	+/+
AAC30	+/+	AAC70	+/+	AAC110	+/+	AFA36	+/+
AAC31	+/+	AAC71	+/+	AAC111	+/+	AFA42	+/+
AAC32	+/+	AAC72	+/+	AAC112	+/+	AFA43	+/+
AAC33	+/+	AAC73	+/+	AAC113	+/+	AFA63	+/+
AAC34	+/+	AAC74	+/+	AAC114	+/+	AFA67	+/+
AAC35	+/+	AAC75	+/+	AAC115	+/+	AFA70	+/+
AAC36	+/+	AAC76	+/+	AAV20	+/+	AFA79	+/+
AAC37	+/+	AAC77	+/+	ALX25	+/+	AFA81	+/+
AAC38	+/+	AAC78	+/+	ALX26	+/+	AFA82	+/+
AAC39	+/+	AAC79	+/+	ALX27	+/+	AFA114	+/+
AAC40	+/+	AAC80	+/+	ALX28	+/+	AFA115	+/+

Tabela 2. Resumo dos indivíduos. Código dos indivíduos testados para o gene GJB6.

Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6
AFA117	+/+	ALE71	+/+	ALE116	+/+	ABG5	+/+
AFA124	+/+	ALE72	+/+	ALE117	+/+	ABG6	+/+
AFA125	+/+	ALE73	+/+	ALE118	+/+	ABG8	+/+
AFA126	+/+	ALE74	+/+	ALE119	+/+	ABG9	+/+
AFA127	+/+	ALE75	+/+	ALE120	+/+	ABG11	+/+
AFA128	+/+	ALE76	+/+	ALE121	+/+	ABG12	+/+
AFA129	+/+	ALE78	+/+	ALE122	+/+	ABG13	+/+
AFA130	+/+	ALE81	+/+	ALE123	+/+	ABG14	+/+
AFA131	+/+	ALE82	+/+	ALE124	+/+	ABG15	+/+
AFA132	+/+	ALE83	+/+	ABR13	+/+	ABG16	+/+
AFA133	+/+	ALE84	+/+	ABR18	+/+	ABG17	+/+
AFA134	+/+	ALE85	+/+	ABR28	+/+	ABG18	+/+
AFA135	+/+	ALE86	+/+	ABR29	+/+	ABG19	+/+
AFA136	+/+	ALE87	+/+	ABR30	+/+	ABG20	+/+
AFA137	+/+	ALE88	+/+	AVC1	+/+	ABG23	+/+
AFA138	+/+	ALE89	+/+	AVC2	+/+	ABG24	+/+
AFA139	+/+	ALE90	+/+	AVC3	+/+	ABG25	+/+
AFA140	+/+	ALE91	+/+	AVC4	+/+	ABG26	+/+
AFA141	+/+	ALE92	+/+	AVC5	+/+	ABG27	+/+
AFA142	+/+	ALE93	+/+	AVC6	+/+	ABG28	+/+
AFA143	+/+	ALE94	+/+	AVC7	+/+	ABG30	+/+
AFA144	+/+	ALE95	+/+	AVC8	+/+	APO25	+/+
AFA145	+/+	ALE96	+/+	AVC9	+/+	APO26	+/+
AFA146	+/+	ALE98	+/+	AVC10	+/+	APO27	+/+
AFA147	+/+	ALE99	+/+	AVC11	+/+	APO28	+/+
AFA148	+/+	ALE100	+/+	AVC12	+/+	APO29	+/+
AFA149	+/+	ALE101	+/+	AVC13	+/+	APO30	+/+
AFA150	+/+	ALE102	+/+	AVC14	+/+	APO31	+/+
ALE56	+/+	ALE103	+/+	AVC16	+/+	APO32	+/+
ALE58	+/+	ALE105	+/+	AVC17	+/+	APO33	+/+
ALE59	+/+	ALE106	+/+	AVC18	+/+	APO34	+/+
ALE60	+/+	ALE107	+/+	AVC19	+/+	APO35	+/+
ALE61	+/+	ALE108	+/+	AVC20	+/+	APO36	+/+
ALE62	+/+	ALE109	+/+	AVC21	+/+	APO37	+/+
ALE63	+/+	ALE110	+/+	AVC22	+/+	APO38	+/+
ALE65	+/+	ALE111	+/+	AVC23	+/+	APO39	+/+
ALE67	+/+	ALE112	+/+	ABG1	+/+	APO40	+/+
ALE68	+/+	ALE113	+/+	ABG2	+/+	APO41	+/+
ALE69	+/+	ALE114	+/+	ABG3	+/+	APO42	+/+
ALE70	+/+	ALE115	+/+	ABG4	+/+	APO43	+/+

Tabela 3. Resumo dos indivíduos. Código dos indivíduos testados para o gene GJB6.

Indivíduos	GJB6	Indivíduos	GJB6
APO44	+/+	ANO35	+/+
AVR20	+/+	ANO36	+/+
AVR21	+/+	ANO38	+/+
AVR23	+/+	ANO39	+/+
AVR24	+/+	ANO40	+/+
AVR25	+/+	ANO41	+/+
AVR26	+/+	ANO43	+/+
AVR29	+/+	ANO44	+/+
AVR30	+/+	ANO45	+/+
AVR31	+/+	ANO46	+/+
AVR33	+/+	ANO47	+/+
AVR34	+/+	ANO48	+/+
ANO1	+/+	ANO50	+/+
ANO2	+/+	ANO51	+/+
ANO4	+/+	ANO52	+/+
ANO5	+/+	ANO53	+/+
ANO6	+/+	ANO54	+/+
ANO7	+/+	ANO55	+/+
ANO8	+/+	ANO56	+/+
ANO10	+/+	ANO57	+/+
ANO11	+/+	ANO58	+/+
ANO13	+/+	ANO59	+/+
ANO16	+/+	ANO61	+/+
ANO17	+/+	ANO62	+/+
ANO18	+/+	ANO63	+/+
ANO19	+/+	ANO64	+/+
ANO20	+/+	ANO67	+/+
ANO21	+/+	ANO68	+/+
ANO22	+/+	ANO69	+/+
ANO23	+/+	ANO70	+/+
ANO24	+/+	ANO71	+/+
ANO25	+/+	ANO83	+/+
ANO27	+/+	ANO84	+/+
ANO28	+/+	ANO85	+/+
ANO29	+/+	ANO86	+/+
ANO30	+/+	ANO88	+/+
ANO31	+/+	ANO89	+/+
ANO32	+/+	ANO90	+/+
ANO33	+/+	ANO91	+/+
ANO34	+/+	-	-

ANEXO E – Primers utilizados para a mutagênese dirigida

Nome do <i>primer</i>	Sequência	Dimensão (Pb)	Tem p. <i>melting</i>	G C (%)	Alteração
Leu213 X-F	TGCTGAATGTCACTGAATTGTGTTATTAGCTAATTA GATATTGTTCTG	48	78.2	31.2	TTG (Leu)>TAG (STOP)
Leu213 X-R	CAGAACAATATCTAATTAGCTAATAACACAATTTCAG TGACATTCAGCA	Complementar reverso do Leu213X-F			
Gly160Ser-F	CTATGTCATGTACGACAGCTTCTCCATGCAGCG	33	79.1	51.5	GGC (Gly)>AGC (Ser)
Gly160Ser-R	CGCTGCATGGAGAAGCTGTCGTACATGACATAG	Complementar reverso do G160S-F			
Gly160Cys-F	CTATGTCATGTACGACAGCTTCTCCATGCAGCG	33	79.1	51.5	GGC (Gly)>TGC (Cys)
Gly160Cys-R	CGCTGCATGGAGAAGCAGTCGTACATGACATAG	Complementar reverso do G160C-F			